

Aus der Hautklinik
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. med. G. W. Korting)

**Zum Einfluß von bindegewebswirksamen Substanzen
(beta-Aminopropionitril und Prednisolon)
auf die Kollagenpeptidaseaktivität im Rattenserum**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen**

vorgelegt von

Ulrich Heidbüchel

aus

Essen/Ruhr

Mainz 1975

Aus der Hautklinik
der Johannes Gutenberg - Universität Mainz
(Direktor: Prof.Dr.med.G.W.Korting)

Zum Einfluß von bindegewebswirksamen Substanzen
(beta- Aminopropionitril und Prednisolon)
auf die Kollagenpeptidaseaktivität im Rattenserum

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes Gutenberg - Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von

ULRICH HEIDBÜCHEL

aus

Essen/Ruhr

Mainz 1975



Fachbereichsdekan:

Professor Dr. E. Straub

Referent:

Professor Dr. E. Morsches

Korreferent:

Professor Dr. G.W. Kortin

Meiner Mutter gewidmet

Inhaltsverzeichnis

- I. Einleitung
 - a. Kollagen im Organismus höherer Tiere und des Menschen
 - b. Molekularer Aufbau und Kollagensynthese
 - c. Mechanismen des Kollagenabbaues
- II. Problemstellung
- III. Experimenteller Teil
 - a. Tierversuche
 - b. Gewinnung und Aufbewahrung des Rattenserums
 - c. Kollagenpeptidaseaktivitätsmessung
 - 1. Prinzip der Enzymaktivitätsbestimmung
 - 2. Reagenzien
 - 3. Bestimmungsansatz
 - 4. Leerwertansatz
 - 5. Aufstellen von Eichkurven
 - 6. Einheit der Kollagenpeptidaseaktivität
 - d. Statistisches Verfahren
- IV. Ergebnisse
- V. Diskussion
- VI. Zusammenfassung
- VII. Tabellen
- VIII. Literaturverzeichnis

I. Einleitung

a. Kollagen im Organismus höherer Tiere und des Menschen

Als charakteristische Komponente der mesenchymalen Gewebe nimmt das Skleroprotein Kollagen in der molekularen Architektur höherer Tiere eine Schlüsselposition ein, da dieses Protein maßgeblich für die Verteilung der von innen und außen auf den Körper einwirkenden Kräfte im Organismus verantwortlich ist. Mit einem Anteil von etwa 30% am Gesamtkörpereiweiß (52,206) stellt es beim Menschen das mengenmäßig wichtigste Protein dar. Es ist deshalb verständlich, daß dieser Bindegewebsbaustein an den verschiedensten physiologischen und pathologischen Vorgängen im Körper beteiligt ist. Die Untersuchung des Kollagenstoffwechsels hat große Bedeutung zur Klärung vieler Krankheitsbilder, nicht nur der Kollagenosen, und gewährt Einblicke in physiologische Abläufe, wie zum Beispiel das Altern.

Kollagen ist durch eine besondere Aminosäurezusammensetzung gekennzeichnet (52,73,117,193): Der hohe und außerordentlich konstante Gehalt an Glycin, Prolin, Hydroxyprolin und den polaren Aminosäuren Glutaminsäure, Asparaginsäure, Arginin und Lysin ist typisch. Besondere Bedeutung kommt dem Hydroxyprolin zu, da es, abgesehen von kleinen Mengen im Elastin (13,213), praktisch nur im Kollagen zu finden ist (52,193). Außerdem wird diese "Iminosäure" nicht direkt in das Kollagenmolekül eingebaut; die Bildung erfolgt erst im Verlauf der Kollagensynthese aus der Vorstufe Prolin. Hydroxyprolin führt somit zu einer

natürlichen Markierung als Leitfossil des Kollagens und eröffnet damit Möglichkeiten zur Untersuchung des Kollagenstoffwechsels. Dieser soll im folgenden kurz skizziert werden.

b. Molekularer Aufbau und Kollagensynthese

Der Kollagenaufbau läuft nach den allgemein gültigen Mechanismen der Proteinsynthese ab (14,25, 161,193).

Die Primärstruktur entspricht der in Form von Basen-Tripletts im Kern von Fibroblasten (197) gespeicherten Information, die mit Hilfe der verschiedenen Ribonukleinsäuren im rauen endoplasmatischen Retikulum die Synthese der Peptidketten steuert. Wenn auch bis heute eine genaue Sequenzanalyse nicht geglückt ist, so lassen sich doch Kettenabschnitte, die aus leichten Aminosäuren (Glycin, Alanin) und Prolin oder Hydroxyprolin bestehen und solche, die schwere, polare Aminosäuren enthalten, beschreiben (73). Darüber hinaus sind genetisch fixierte Sequenzunterschiede bekannt, welche je nach untersuchtem Stützgewebe unterschiedliche Verteilungsmuster von Kollagenmolekülen erkennen lassen (128,175, 184). Ein Codon für Hydroxyprolin fehlt, diese Aminosäure wird erst in der prolinreichen, hydroxyprolinfreien Kette (Protokollagen, 101) mit Hilfe einer cytoplasmatischen mischfunktionellen Oxidase aus ihrer Vorstufe Prolin gebildet (100,111,112,113). Ein analoger Mechanismus mit einem separaten Enzymsystem existiert für die Hydroxylierung von Lysin (71,114). Der im

übrigen sehr exakt eingehaltene Grad der Hydroxylierung variiert altersabhängig (7).

Für die weitere Konformation, die sich zwangsläufig aus der Aminosäuresequenz ergibt, sind die "Helixbrecher" (R.K.Zahn) Prolin und Hydroxyprolin von besonderer Bedeutung, da sie die freie Drehbarkeit der Peptidkette zwischen dem alpha-C-Atom und dem N-Atom aufheben und damit weder die trans-Anordnung in der gestreckten Peptidkette, noch die alpha-Schraube nach FÄU-LING (181) mit zur Schraubenachse parallel gestellten H-Brücken zulassen. RAMACHANDRAN und KARTHA (191,192) sowie RICH und CRICK (194) entwarfen aus diesen stereochemischen Überlegungen ein Modell, nach dem das Kollagenmolekül aus 3 linksgewundenen Schrauben (Identitätsperiode 8,58 Å), die ihrerseits wieder zu einer Superschraube (Identitätsperiode 28,6 Å) verdrillt sind, besteht. Die Länge eines solchen als Tropokollagen (201) bezeichneten Kollagenmonomers beträgt 2800 Å bei einer Dicke von 14 Å. Zahlreiche Untersuchungen über den Mechanismus der Zusammenlagerung zur Superhelix, der intrazellulären Lösung und des Transportes, der Ausschleusung und des extrazellulären Transportes dieser Monomere haben zum Nachweis eines Kollagenvorläufers, dem Prokollagen, geführt (161,211). Dabei handelt es sich um ein am Aminoende verlängertes Precursormolekül. Das zusätzliche Molekülstück wird nach Erfüllung der genannten Aufgaben - vielleicht schrittweise - mit Hilfe einer Prokollagenpeptidase entfernt (135,136).

Extrazellulär entstehen in der ebenfalls vom Fibroblasten synthetisierten Grundsubstanz (53) zunächst lockere Aggregate der Tropokollagenmoleküle, die sich mit wachsender Entfernung vom Fibroblasten immer deutlicher in typischer "head to tail" und "side to side" Anlagerung (124) zu Fibrillen formieren (48). Dabei sollen die Molekülenden ähnliche Kennfunktionen übernehmen wie das Aminoende des Prokollagens und sowohl die Orientierung der Monomere in der Fibrille als auch den Fibrillendurchmesser steuern (141). Im Laufe eines Reifungs- und Alterungsprozesses kommt es durch Ausbildung von intra- und intermolekularen Quervernetzungen zu einer zunehmenden Verfestigung der Fibrillen und zu einer verstärkten Resistenz gegen den enzymatischen Angriff (16,94,99,183). Ausdruck der Alterung ist die Abnahme der Löslichkeit der Fibrillen (62,239), die sich erst durch Neutralsalzlösungen steigender Konzentrationen, dann eventuell durch saure Puffer und schließlich gar nicht mehr lösen lassen (63,72,95). Die entsprechenden Fraktionen im Bindegewebe werden als neutralsalzlösliches (NLK), säurelösliches (SLK) und unlösliches Kollagen (ULK) bezeichnet. Soweit es sich um tatsächlich neusynthetisiertes und nicht durch den Abbau unlöslichen Kollagens entstandenes lösliches Kollagen handelt, wird auch der Begriff "nascent collagen" verwendet (106). Das SLK entspricht dem von OREKHOVICH als Prokollagen bezeichneten Extrakt (zit.n.182). Der schließlich erreichte Durchmesser der Fibrillen ist nicht nur vom Alter, sondern auch von der Funktion der entsprechenden Fasern abhängig (165).

Eine Verzögerung der Verfestigung der Fibrillen durch eine Störung der intermolekularen Bindungen hat einen verstärkten Abbau (87,166) der verstärkt anfallenden löslichen Kollagen-vorstufen zur Folge. Solche Zustände des Bindegewebes kennt man bei lathyritischen Tieren (123), oder bei Tieren, die unter hohen Gaben des Corpus-Luteum-Hormons stehen (127). Umgekehrt verringert sich der Abbau der löslichen Kollagenfraktionen gegenüber der Norm, wenn die Ausbildung der intermolekularen Bindungen beschleunigt ist, was man durch Gaben von Kortikosteroiden an Versuchstieren erreichen kann (126).

Der Stoffwechsel des Kollagens als Element des sogenannten "bradytrophen" Bindegewebes stellt sich mit Hilfe radioaktiv markierter Verbindungen im Gegensatz zu älteren Beobachtungen als ein Fließgleichgewicht mit erstaunlich hoher Umsatzgeschwindigkeit dar (Übersicht s. 240). So beträgt die Halbwertszeit für das NLK nur 2 bis 3 Tage (46,74,93,123) und für das SLK 25 Tage (47). Tatsächlich langsam verläuft dagegen der Abbau des ULK mit einer Halbwertszeit von 100 bis 300 Tagen (47,172). Auch das Größenverhältnis zwischen den einzelnen Fraktionen kann durch tracerkinetische Untersuchungen bestimmt werden (40,164). Über die biologische Kontrolle der Synthese des Kollagens, zum Beispiel im Sinne eines "feedback" Mechanismus, liegen nur Spekulationen vor (14,25,49,50).

c. Mechanismen des Kollagenabbaus

Der Abbau der nativen Kollagenfibrillen läuft entsprechend deren komplexer Natur in mehreren Schritten ab (Übersicht s. 54,174,224): Zunächst kommt es durch die Auflösung der Grundsubstanz, zum Beispiel durch Kathepsin D (78, 236), zu Veränderungen der Fibrillen. Der damit ermöglichte Angriff von Kathepsin B₁ auf die intermolekulare Quervernetzung führt im zweiten Schritt zu löslichen Tropokollagenmolekülen. Spezifische Kollagenasen, auch als Kollagen-Proteasen bezeichnet (54,224), spalten nun mit einer Spezifität für Gly-Leu-Tyr oder Gly-Leu-Gly alle drei Ketten des Tropokollagenmoleküls an einer Stelle, so daß zwei Teilstücke von 1/4 und 3/4 der ursprünglichen Länge entstehen (10,36,38,64,75,78,79,103,119,137, 138,139,151,158,169,198). Der Nachweis dieser Enzyme gelang zuerst GROSS und LAPIERE (66, 170). Auch der Nachweis für das Vorkommen im Säugetierorganismus wurde erbracht, zum Beispiel im Meerschweinchen (61), im Uterus (98) und Knochen (1,241) der Ratte, beim Menschen in Haut (37,39,140), Granulocyten (138), Synovia (43) und in der Synovialflüssigkeit (76). (Übersicht s. 70). Möglicherweise laufen zweiter und dritter Schritt in umgekehrter Reihenfolge ab (174).

Die entstandenen Fragmente haben eine der Körpertemperatur entsprechende Denaturierungstemperatur. Für den weiteren Abbau der polaren Regionen kommen deshalb unspezifische Proteasen (54,240) und schließlich Exo- und Endopeptidasen

in Betracht (107,108). Neben den spezifischen Kollagenasen wird auch verschiedenen lysosomalen Enzymen die Fähigkeit zur Kollagenolyse nativer Moleküle zugesprochen (3,11,22,78).

Die Verdauung der nichtpolaren Abschnitte des Kollagenmoleküls kann im vierten Schritt durch eine erstmals von STRAUCH (218) beschriebene Klasse kollagenspaltender Enzyme vorgenommen werden. Der Nachweis gelang zum Beispiel in Zellkulturen verschiedener Säugetiere (219,226, 227), in der Invasionszone von Tumoren des Menschen (104,132) und in Haut-Tumoren der Maus (196), in menschlichen Blutseren (57,59), in Homogenaten des Gastro-Intestinaltraktes (58), in verschiedenen Organen von Kaninchen (56, 146), in Spermatozoen (116), in cariösem Dentin (147,148) und in der menschlichen Haut (102). Es handelt sich hierbei um die einzigen bisher bekannten Enzyme im Organismus höherer Tiere, deren Spezifität entsprechend der bakteriellen Kollagenase Clostridiopeptidase A (E.C. 3.4.4.19.) auf die im apolaren Bereich vorkommende Sequenz Gly-Pro(Hyp)-X-Gly-Pro(Hyp) ausgerichtet ist (219,226). Da sie jedoch im Gegensatz zu den bakteriellen Kollagenasen praktisch nur denaturiertes, nicht aber natives Kollagen und auch nicht andere denaturierte Proteine, wie zum Beispiel Hämoglobin, Serumalbumin und -globin und Kasein angreifen (223, 224), werden sie als Kollagenpeptidasen (54, 221), Collagenase-like-peptidase (116,190), Peptidyl-Peptid-Hydrolasen (185) oder, soweit sie bakteriellen Ursprungs sind, auch als Pseudokollagenasen (162) bezeichnet. Es ist

bisher noch kein physiologisches Substrat für diese Kollagenpeptidasen isoliert worden, so daß über ihre Beziehungen zum Kollagenstoffwechsel noch keine definitiven Aussagen möglich sind (55,221). Ergebnisse von Untersuchungen über die Aktivität der Kollagenpeptidasen in verschiedenen Organen bzw. Geweben unter physiologischen und pathologischen Bedingungen legen jedoch direkte Beziehungen zum Ausmaß des Kollagenumsatzes nahe (224).

Für die weitere (intrazelluläre) Spaltung der durch die Kollagenpeptidase erhaltenen Tripeptide stehen entweder Aminopeptidasen oder Carboxypeptidasen zur Verfügung (32,33). Die endgültige Aufspaltung in Aminosäuren übernehmen Dipeptidasen (E.C. 3.4.3.6. oder E.C. 3.4.3.7.) (174). Lediglich die Dipeptide Pro-Hyp werden größtenteils als peptidgebundenes Hydroxyprolin im Urin ausgeschieden (159), wobei proteingebundenes Hydroxyprolin (Collagen-like Protein, CLP) wahrscheinlich eine Zwischenphase auf dem Weg zur Niere darstellt (200). Die intra- und extrazelluläre Lokalisation verschiedener Schritte des Kollagenabbaues ist bisher nicht sicher auszumachen (78,174, 240).

II. Problemstellung

Die relativ aufwendigen Bestimmungsmethoden der Hydroxyprolinfraktionen im Serum (Übersicht s. 117), sowie der Hydroxyprolinausscheidung im Urin lassen zwar weitgehende Rückschlüsse auf den Kollagenstoffwechsel zu (133, 134), doch sind diese Verfahren für die Erfassung feinerer Abbauvorgänge und für das Verständnis von Bindegewbserkrankungen, auch der Haut, bisher nicht ausreichend (144). Untersuchungen zwischen Veränderungen der Kollagenpeptidaseaktivität im Serum, deren Bestimmung außerdem wesentlich einfacher und schneller erfolgen kann als die des Hydroxyprolins, und dem Umsatz des Kollagens liegen im übrigen kaum vor.

In dieser Arbeit soll deshalb an Hand gezielter Beeinflussungen des Kollagenstoffwechsels (Übersicht über Beeinflussungsmöglichkeiten s. 240), durch Anwendung der bindegewebswirksamen Substanzen beta-Aminopropionitril und Prednisolon der Einfluß auf die Aktivität der Kollagenpeptidase im Rattenserum, auch in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer, untersucht werden. Anschließend sollen die Ergebnisse dieser Messungen in Beziehung zu den bisherigen Beobachtungen über das Verhalten der Kollagenpeptidase unter physiologischen und pathologischen Bedingungen gesehen werden und mit den bekannten Auswirkungen der benutzten Substanzen auf den Kollagenstoffwechsel verglichen werden.

III. Experimenteller Teil

a. Tierversuche

Für die Versuche wurden weibliche Albinoratten eines Inzuchtstammes (Sprague Dawley) verwendet. Je 15 Ratten bildeten 6 Fütterungsgruppen. Unter ansonsten gleichen Versuchsbedingungen wurden die bindegewebswirksamen Substanzen beta-Aminopropionitril* und das Kortikosteroid Prednisolon**, in pulverisierter Form unter die Grundnahrung gemischt, über je 14 und 28 Tage verfüttert. Jeweils eine Gruppe erhielt nur die Grundnahrung, bestehend aus Schweinehackfleisch und Standardtrockenfutter*** im Verhältnis 1:1. Für jede Ratte waren pro Tag 20 g dieser Mischung vorgesehen. Die verabfolgten Mengen an Medikamenten, die Aufteilung der Gruppen, sowie die Gewichte der Ratten zu Beginn und Ende der Fütterung sind aus den Tabellen 1 (s.S. 11) und 2-7 (s.S. 48-53) zu entnehmen.

b. Gewinnung und Aufbewahrung der Rattenserum

Zur Gewinnung des Serums wurden die Ratten mit Äther betäubt. Die nach einem Hautschnitt am Halse frei liegende Vena jugularis wurde mit einer kleinen Schere eröffnet und das frei

* beta-Aminopropionitril fumarat, Serva, Entwicklungslabor Heidelberg

** Ketocort-H^(R), Desitin-Werke Karl Klinke GmbH, Hamburg

*** Altromin-R, Fa. Altrogge, Lage/Lippe

Wirkstoff	Gruppe	Menge (mg) pro Tag	Menge (mg) gesamt	Dauer (Tage)
2	1	ø	ø	14
ø	2	ø	ø	20
BAPN	3	40	500	14
BAPN	4	40	1120	25
Prednisolon	5	1./2.Tag:1 ab 3.Tag:0,3	5,0	14
Prednisolon	6	1./2.Tag:1 ab 3.Tag:0,3	9,8	20

Tab. 1

Dosierung von β -Aminopropionitril und Prednisolon sowie Fütterungsdauer der einzelnen Versuchsgruppen

auslaufende Blut in Zentrifugenröhrchen auffangen. Diese wurden im Kühlschrank bei $+4^{\circ}\text{C}$ bis zur Weiterverarbeitung innerhalb einer Stunde aufbewahrt. Das Blut wurde mit 4000 U/min. 10 min. zentrifugiert. Von den leichteren Ratten konnte oft nur wenig über 1 ml Serum gewonnen werden. Da für eine zweifache Enzymbestimmung 3 ml notwendig waren, mußte das Serum mit physiologischer Kochsalzlösung entsprechend dem Vorgehen bei Gewebshomogenaten (60) verdünnt werden. Die große Empfindlichkeit der angewandten Methode (57,221) gestattete dies. Einheitlich für alle Proben betrug die Verdünnung 1 ml Serum zu 2 ml physiologischer Kochsalzlösung.

c. Kollagenpeptidaseaktivitätsmessung

1. Prinzip der Enzymaktivitätsbestimmung

Die Bestimmung der Kollagenpeptidaseaktivität im Serum erfolgte nach der von GRIES et al. (57) angegebenen Methode: Dem Serum wird ein Peptid folgender Sequenz zugesetzt: PZ-Pro-Leu-Gly-Pro-d-Arg-OH (PZ : p-phenylazobenzoyloxycarbonyl). Dieses von WÜNSCH und HEIDRICH (242) entwickelte Substrat entspricht in seiner Aminosäuresequenz der des apolaren Bereiches eines Kollagenmoleküls. Es wird außer von bakteriellen Kollagenasen wie Clostridiopeptidase A praktisch nicht von anderen Enzymen umgesetzt, da es durch die d-Form des Arg widerstandsfähig gegen den Angriff durch Trypsin, Carboxypeptidase und andere Proteasen, die eventuell vorhanden sein können, ist. Die im Serum enthaltene Kollagenpeptidase spaltet das Fragment PZ-Pro-Leu ab, welches bei saurem pH in wässriger Lösung unlöslich ist (im Gegensatz zum Gly-Pro-d-Arg-OH, welches durch das Arg leicht wasserlöslich ist) und mit organischen Lösungsmitteln extrahiert werden kann. Der Rest PZ hat im UV-Bereich ein Absorptionsmaximum. Aus der photometrischen Ermittlung der Menge des entstandenen Fragmentes errechnet sich dann die Kollagenpeptidaseaktivität.

2. Reagenzien

1. 0,05 molarer Tris-HCl-Puffer, pH 7,2
0,605 g TRIS(hydroxymethyl)aminomethan
p.a. in 100 ml Aqua bidest. lösen, mit
ca. 88 ml 0,05 normaler HCl p.a. auf
pH 7,2 einstellen
2. Zitronensäure 10 % (W/V) p.a.
3. Substratlösung
1 mg PZ-Pro-Leu-Gly-Pro-d-Arg-OH* in
1 ml 0,05 molarem Tris-HCl-Puffer pH 7,2
lösen
4. Eichlösung
1 mg PZ-Pro-Leu* in 2 ml 0,05 molarem
Tris-HCl-Puffer pH 7,2 lösen, 1 ad 25 ml
mit Tris-HCl-Puffer verdünnen
5. Benzol p.a.

3. Bestimmungsansatz

1 ml (verdünntes) Serum wurde mit 2 ml Substratlösung in einem Zentrifugenröhrchen mit Schliffstopfen vermischt und eine Stunde bei 25° C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde dann mit 1 ml 10%iger Zitronensäure gestoppt. Nach Zugabe von 5 ml Benzol wurden die Zentrifugenröhrchen kräftig geschüttelt. Durch 10-minütiges Zentrifugieren mit 4000 U/min. wurden wässrige und organische Phase getrennt. Anschließend erfolgte in der

* Hersteller: Fluka AG, CH-9470 Buchs, SG
(Schweiz)

Benzolphase die Extinktionsmessung bei 334 nm gegen den Leerwert mit einem Zeiss PMQ II Spektralphotometer. Der Bestimmungsansatz wurde jeweils doppelt bzw. dreifach durchgeführt.

4. Leerwertansatz

Auch hierbei wurden wie beim Bestimmungsansatz 1 ml (verdünntes) Serum mit 2 ml Substratlösung vermischt, wobei aber durch sofortige Zugabe der Zitronensäure die Kollagenpeptidase nicht wirksam werden konnte. Nach 1 h Inkubation erfolgte die Extraktion wie oben beschrieben. Die abpipettierte Benzolphase diente dann zur Einstellung des Photometers auf: Extinktion = 0. Vor der eigentlichen photometrischen Bestimmung wurden die Extinktionen der mit reinem Benzol gefüllten Küvetten gegeneinander gemessen, um deren unterschiedliche Eigenextinktionen auszugleichen. Die Konzentration an PZ-Pro-Leu errechnete sich aus den Extinktionen einer für jeden Versuchstag unter Verwendung einer Verdünnungsreihe neu aufzustellenden Eichkurve.

5. Aufstellen der Eichkurve

Jeweils 0,5 ml, 1,0 ml, 1,5 ml und 2,0 ml der Eichlösung wurden in Zentrifugenröhrchen mit Schliffstopfen mit 0,05 molarem Tris-HCl-Puffer pH 7,2 auf 3 ml verdünnt. Nach dem Zusatz von 0,1 ml Zitronensäure und 5 ml Benzol wurden die gut verschlossenen Zentri-

fugenröhrchen kräftig geschüttelt und 10 min. mit 4000 U/min. zentrifugiert. Die Extinktion der organischen Phase wurde dann jeweils gegen reines Benzol ermittelt. Die so gefundenen Werte (s. Tab. 8 u. 9, S. 54-55) wurden in einem Koordinatensystem auf der Ordinate, die entsprechenden Mengen an PZ-Pro-Leu auf der Abszisse eingetragen (s. Abb. 1, S. 15). Durch die für jeden Versuchstag aufgezeichneten Punkte wurde eine Gerade gemittelt, wobei die Abweichung der Punkte ein Anhalt für die Genauigkeit der Meßergebnisse ist. Diese Eichkurve ermöglichte das Ablesen der Konzentrationen an PZ-Pro-Leu aus den im Bestimmungsansatz gemessenen Extinktionen. Aus der Linearität des Graphen im betrachteten Bereich ergab sich weiter die Möglichkeit der direkten Umrechnung der Extinktionen in Substratkonzentrationen und damit in Enzymaktivitätseinheiten.

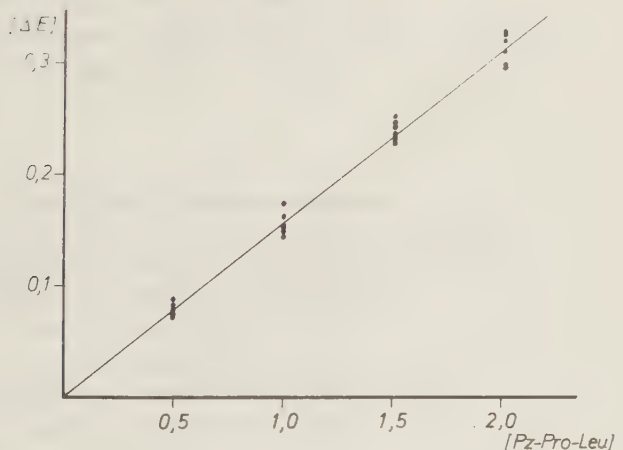


Abb. 1 Eichkurve zur Bestimmung des abgespaltenen PZ-Pro-Leu aus den gemessenen Extinktionen. Angabe der Konzentration an PZ-Pro-Leu als Menge des eingesetzten Eichlösungs in ml

6. Einheit der Kollagenpeptidaseaktivität

GRIES et al. (57,59) definieren eine Kollagenaseeinheit (collagenase unit, CU) als die Kollagenpeptidaseaktivität, welche 1 μ mol PZ-Pro-Leu pro Liter Serum pro Stunde abspaltet. Die absolute Enzymaktivität liegt wahrscheinlich höher als die beobachtete, da bei der Messung das künstliche Substrat mit dem natürlichen (falls dies im Serum vorhanden ist) konkurriert (219). Bei einem Molekulargewicht des PZ-Pro-Leu von 466,56 g mußte also, wie nach Umrechnung aus Abb. 1 folgt, der Extinktionswert mit 91,33 multipliziert werden, um das Ergebnis in CU zu erhalten. Der in Vorversuchen ermittelte relative Anstieg der Peptidaseaktivität in verdünnten Seren (s.Tab.18,S.63) entsprach dem Verhalten in Gewebshomogenaten (60). Dies blieb jedoch unberücksichtigt, da die Ergebnisse nur untereinander verglichen werden sollten und die Verdünnungen für alle Messungen einheitlich waren. Eine definitive Erklärung für diese Beobachtungen kann im übrigen ebenso wenig wie für die Befunde an Gewebeproben gegeben werden.

d. Statistisches Verfahren

Zur statistischen Beschreibung der Ergebnisse wurde ein parameterfreies Verfahren gewählt. Verwendung fand der nach KRUSKAL und WALLIS benannte Rangtest:

Den Ergebnissen der zu vergleichenden Beobachtungsgruppen werden ohne Rücksicht auf ihre

Gruppenzugehörigkeit nach steigenden Werten Rangzahlen von 1 beginnend zugeordnet. Bei gleichen Meßergebnissen wird der Mittelwert der entsprechenden Rangzahlen gleichmäßig an diese Ergebnisse vergeben. Nun prüft man, ob sich die Summe $T_1, T_2, \dots, T_k$ der Rangzahlen der einzelnen Beobachtungsgruppen mit jeweils $N_1, N_2, \dots, N_k$ Meßergebnissen nur zufällig unterscheiden, und zwar durch die Berechnung einer Testgröße:

$$T = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{i=1}^{i=k} \frac{T_i^2}{N_i} - 3(N+1)$$

wobei

$$N = \sum_{i=1}^{i=k} N_i \quad \text{bedeutet und} \quad \sum_{i=1}^{i=k} T_k = \frac{1}{2} N(N+1) \text{ ist.}$$

Die Mindestgröße von T zum Beweis eines statistisch gesicherten Unterschiedes zwischen den Gruppen ist aus entsprechenden Tabellen zu entnehmen (siehe z.B. 115, 163).

IV. Ergebnisse

Die einzelnen Meßergebnisse sind in den Tabellen 10-15 (s.S.55-60) aufgeführt. Die Umrechnung in CU (collagenase units) erfolgte unter Zugrundelegung des arithmetischen Mittelwertes der jeweiligen Extinktionen.

Eliminiert wurden die Ergebnisse, bei denen die Extinktionen aus der Untersuchung eines Serums stark differierten:

Dazu wurden die einzelnen Beobachtungen in einem rechtwinkligen Koordinatensystem als Punkte mit den Koordinaten (erster Extinktionswert/ zweiter Extinktionswert) betrachtet (s.Abb. 2 u. 3, S.19). Je größer der Abstand von der Geraden mit der Gleichung $y = x$ ist, desto geringer ist die Übereinstimmung der Extinktionen der Messungen eines Serums. Waren 3 Extinktionswerte vorhanden, so wurde der Mittelwert der beiden näher beieinanderliegenden mit dem dritten verglichen. Durch Parallelen zur genannten Gerade wurde der Bereich festgelegt, innerhalb welchem die Messungen verwendet werden sollten. Die Festlegung erfolgte willkürlich so, daß eine möglichst große Anzahl Messungen erfaßt wurde, andererseits aber zu grobe Abweichungen ausgeschlossen wurden.

Die Häufigkeitsverteilung der Höhe der Kollagenaseaktivität ist aus den für jede Behandlungsgruppe aufgestellten Histogrammen ersichtlich (Abb. 4-9, s.S.24-28).

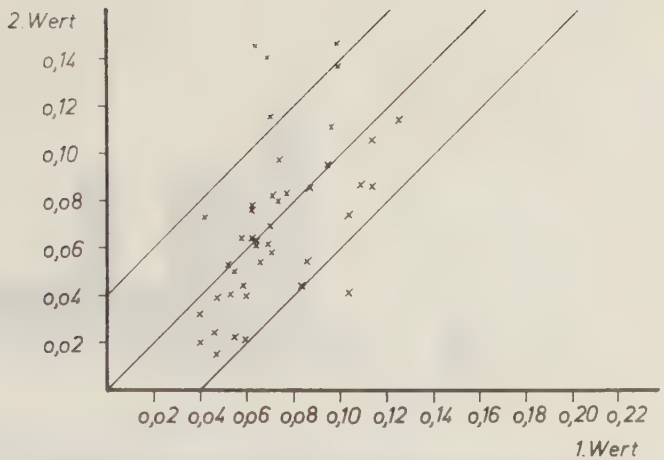


Abb. 2 Graphische Darstellung des Vergleiches zwischen 1. und 2. Extinktionswert der Messungen jeweils eines Serums der Gruppen 1,3,5

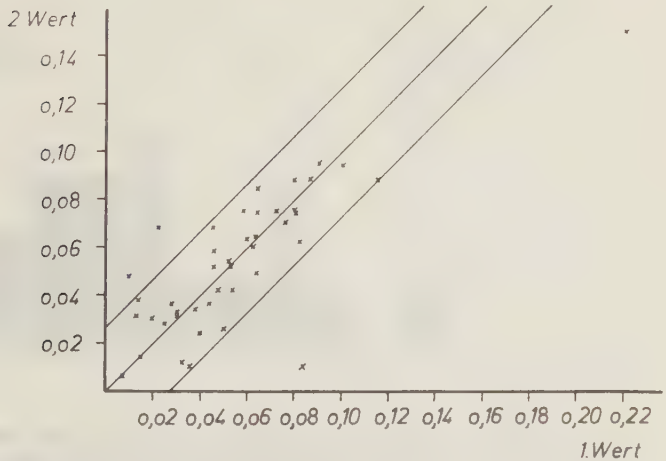


Abb. 3 Graphische Darstellung des Vergleiches zwischen 1. und 2. Extinktionswert der Messungen jeweils eines Serums der Gruppen 2,4,6

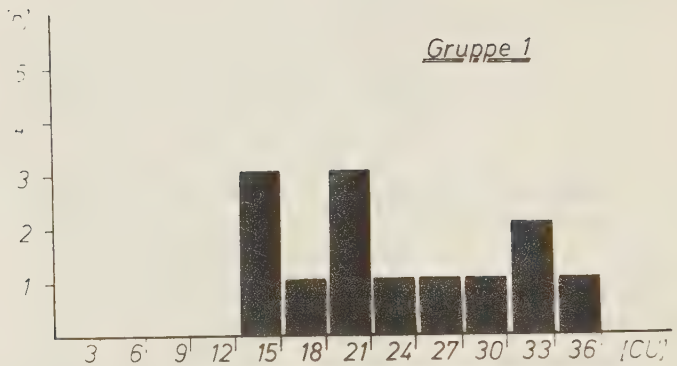


Abb. 4 Häufigkeitsverteilung der Kollagenpeptidaseaktivität (CU) in den Seren der Kontrolltiere nach 14-tägiger Fütterung

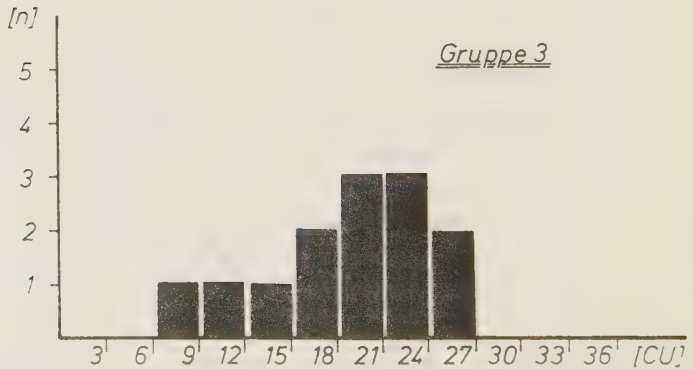


Abb. 5 Häufigkeitsverteilung der Kollagenpeptidaseaktivität (CU) in den Seren der BAPN-behandelten Ratten nach 14-tägiger Fütterung

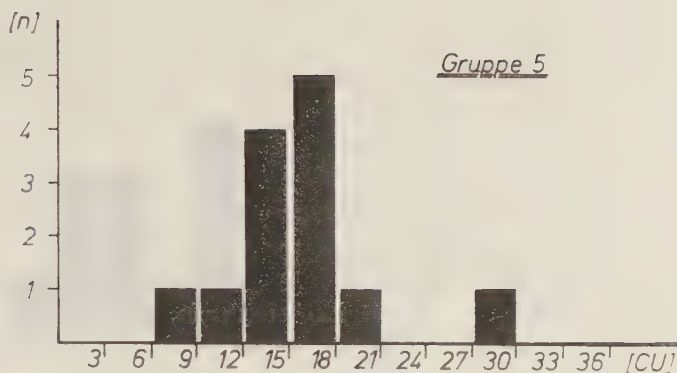


Abb. 6 Häufigkeitsverteilung der Kollagenpeptidase-aktivität (CU) in den Seren der Prednisolon-behandelten Ratten nach 14-tägiger Fütterung

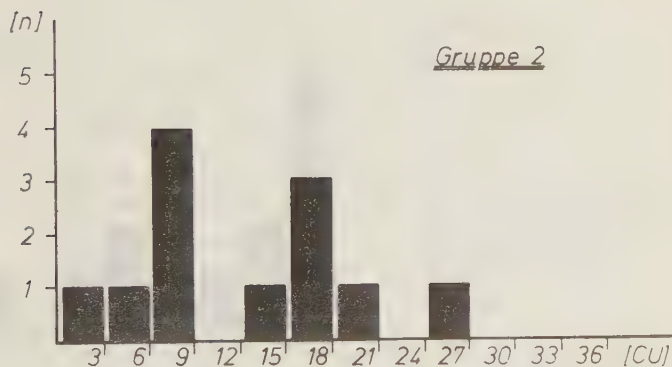


Abb. 7 Häufigkeitsverteilung der Kollagenpeptidase-aktivität (CU) in den Seren der Kontrolltiere nach 28-tägiger Fütterung

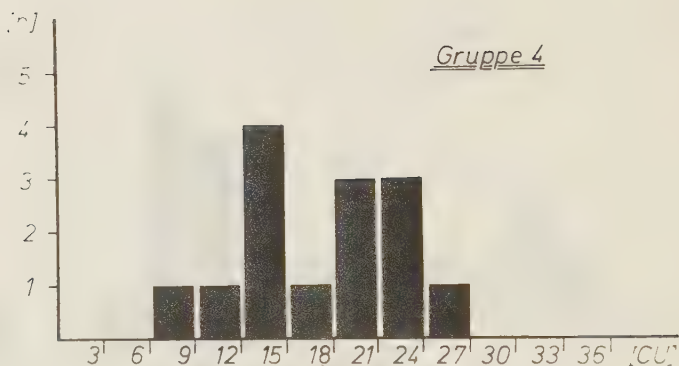


Abb. 8 Häufigkeitsverteilung der Kollagenpeptidase-aktivität (CU) in den Seren der BAPN-behandelten Ratten nach 28-tägiger Fütterung

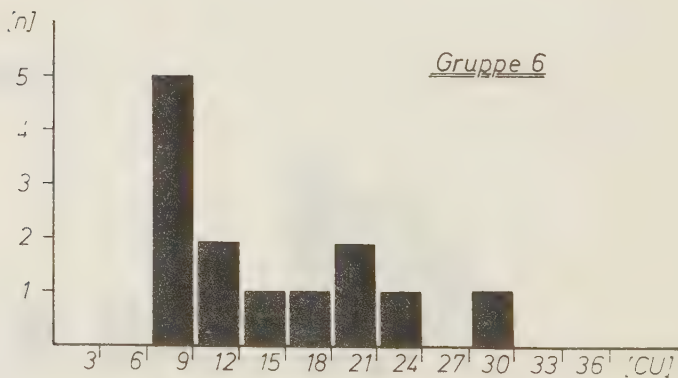


Abb. 9 Häufigkeitsverteilung der Kollagenpeptidase-aktivität (CU) in den Seren der Prednisolon-behandelten Ratten nach 28-tägiger Fütterung

Mit Hilfe des beschriebenen statistischen Verfahrens wurden die Messungen der 14- und 28-tägigen Versuche jeweils untereinander verglichen. Die Rangzahlen und Summen der Rangzahlen sowie die nach der oben angegebenen Formel errechneten Werte der Testgröße T sind aus den Tabellen 16 und 17 (s.S. 61-62) zu entnehmen. Bei einer Mindestgröße für T von 9,21 ergab sich also, wie auch die Histogramme vermuten lassen, kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Serumaktivitäten der Kollagenpeptidase von behandelten und unbehandelten Ratten. Eine Beziehung der Meßergebnisse zu den Gewichten der Ratten wurde nicht aufgestellt. Dies hätte zu einer Scheinkorrelation geführt, da, deutlich sichtbar an den prednisonbehandelten Ratten, die Medikation auch eine (erwartete) Beeinflussung des Körpergewichtes hervorrief.

V.

Diskussion

Es soll nun der Versuch unternommen werden, das Untersuchungsergebnis mit dem Wissen über die Veränderungen der Kollagenpeptidasen und mit den Wirkungen der bindegewebswirksamen Substanzen in Einklang zu bringen.

Die vorliegenden Berichte über Veränderungen der Kollagenpeptidasen beziehen sich größtenteils auf Beobachtungen in Gewebshomogenaten oder Zellkulturen (225).

So berichtete STRAUCH (219,222) von einer positiven Korrelation zwischen der Kollagenpeptidaseaktivität und der Wachstumsrate von Fibroblastenkulturen und einer negativen Korrelation zur Synthese und zu dem Gehalt an Kollagen. Dies entsprach auch Befunden an anderen Geweben mit einem starken Kollagenumbau (222), sowie denen in Invasionszonen von Tumoren, in denen auch eine Erhöhung der Kollagenproteasen zu finden war (104,219). Parallel mit der Abnahme des Kollagengehaltes stieg die Kollagenpeptidaseaktivität im Vergleich zwischen praeneoplastischen Epithelhyperplasien und Papillomen bzw. Karzinomen an (196). Lediglich bei der experimentellen Wundheilung konnte nach vorläufigen Mitteilungen (102) trotz Verstärkung der Protease keine Verstärkung der Peptidaseaktivität gemessen werden. In proliferierenden Bindegeweben (214), wie auch beim experimentell erzeugten Wattedgranulom der Ratte (222) bewirkten antirheumatische und immunsuppressive Substanzen eine Abschwächung der Kollagenpeptidaseaktivitäten.

Weiter waren kollagenolytische Enzyme im Rattenuterus post partum stark vermehrt (97, 149). Die Verminderung im Uterushomogenat von Ratten nach Applikation einer Äthinyl-östradiol/Norgestrel-Kombination ging mit einer Verminderung des DNS-Gehaltes parallel, so daß, wählte man letzteren als Bezugssystem, keine spezifische Änderung entstanden war (185). Gleichzeitig wurde eine Aktivitätsverschiebung im Leberhomogenat vom Lysosomen-

sediment bei unbehandelten zum Lysosomen-sedimentüberstand bei behandelten Ratten beobachtet. Praeovulatorische (Netto-) Verminderung der kollagenolytischen Aktivität im Follikelgewebe von Kaninchen- und Schweineovarien, welche mit einer Aktivitätsanreicherung im Inhalt der Graafschen Follikel einherging, wurde unter anderem durch Verdünnung im Gewebe oder durch kurze Halbwertszeiten der Enzyme zu erklären versucht (42). Heterogene Veränderungen zeigten auch die Messungen an Organen von Kaninchen mit experimentell nach KLINGE erzeugter Arthritis, von thymectomierten Kaninchen und von solchen, die sowohl thymectomiert als auch sensibilisiert worden waren (56,146). Leider wurden die an Aorta, Milz, Lunge, Niere, Leber, Dünndarm- und Colonschleimhaut und -mucularis gewonnenen Ergebnisse nicht im einzelnen gedeutet. Das Synovialgewebe von Patienten mit rheumatoider Arthritis zeigte Aktivitätserhöhungen. Bemerkenswerterweise kam es dabei zu keinen Änderungen in der Synovialflüssigkeit, obwohl lysosomale Enzyme vermehrt vorlagen (236), oder im Serum. Ob als Erklärung ein verstärkter Abbau der Peptidase oder eine Inhibition angenommen werden kann, blieb offen (215).

Uneinheitlich waren auch die Befunde bei pathologischen Zuständen der Leber: Signifikante Aktivitätssteigerungen der Collagenase-like-peptidase wurden bei Patienten mit verschiedenen Lebererkrankungen, besonders bei Cirrhosen, in Blindpunktaten gemessen (199). Die Aktivitäts-

bestimmung im Leberblindpunktat ermöglichte die Trennung der Gruppierung "chronisch aggressive Hepatitis, manifeste Cirrhose" von der Gruppierung "uncharakteristische Leberveränderungen wie fein-, mittel- und großtropfige Verfettung, Hepatosen, geringe degenerative Veränderungen und Residuen nach Hepatitis einschließlich chronisch persistierende Hepatitis". Die erste Gruppierung zeigte gegenüber dem an histologisch weitgehend normalem Lebergewebe bestimmten Normalwert keine und die zweite Gruppierung eine signifikante Aktivitätserhöhung (69). In Punktaten akuter Hepatitiden fanden sich normale Werte (199). Entsprechend den Befunden an Patienten konnten auch bei experimentell erzeugten Fibrosen der Rattenleber Aktivitätssteigerungen beobachtet werden. Gleichzeitig stieg der Hydroxyprolingehalt der Leber an. Die Ratten erhielten über 2 Monate Reis, welcher mit *Penicillium islandicum* vermischt war (199). Eine erhöhte Hydroxyprolinausscheidung bei Leberfibrosen soll fraglich sein (187).

Eine Schädigung durch Thioacetamid in täglichen Dosen von 0,04 g über einen Zeitraum von 12 bis 40 Wochen gefüttert, führte in Rattenlebern zu einer ähnlichen Zunahme von Bindegewebe und Fasern wie eine experimentell erzeugte Cirrhose. Die Messungen wiesen jedoch genau wie im Falle der mit täglich 3 mg Prednisolon über einen Zeitraum von 11 bis 21 Wochen gefütterten Ratten einen signifikanten Abfall der Kollagenpeptidaseaktivität gegenüber denen bei den Kontrolltieren aus.

Stilboestrol hingegen provozierte einen Anstieg. Die Befunde an Homogenaten aus Lungengewebe, glatten Muskeln des Dünn- und Dickdarmes, der Milz und der Aorta zeigten größtenteils ein dem an der Leber gewonnenen entgegengesetztes Bild (55). Die 10-minütige Begasung mit einem CCl_4 -Luftgemisch 2 mal wöchentlich über einen Zeitraum von 6 bis 10 Wochen reduzierte den Kollagenpeptidasegehalt in Rattenlebern auf die Hälfte des Normalwertes bei gleichzeitiger signifikanter Zunahme des Kollagengehaltes (84,86). 2 Wochen nach Absetzen der CCl_4 -Gaben normalisierte sich die Kollagenpeptidaseaktivität im Leberhomogenat (86).

Die Beobachtungen über das Verhalten der Kollagenpeptidaseaktivität im Serum beziehen sich zum Teil auf deren Altersabhängigkeit: So soll es beim Menschen nach einem Maximum bei 30- bis 40-jährigen zu einer stetigen Abnahme der Aktivität kommen (59). Diesen Befunden widersprechen Ergebnisse, nach denen keine alters- oder geschlechtsabhängigen Änderungen festgestellt werden konnten (51,118). Änderungen der Peptidaseaktivitäten fanden sich aber bei Küken mit einer hohen und beim ausgewachsenen Haushuhn mit einer geringen Aktivität (6).

Die Heterogenität der Befunde in pathologisch verändertem Lebergewebe kommt ebenso bei Serumuntersuchungen an Patienten und Versuchstieren mit diversen Leberschäden zum Ausdruck:

Erhöht war die Aktivität bei Patienten mit verschiedenen Formen der Lebercirrhose, und als weitere Parallelität zu den Befunden an Leberhomogenaten (199) lagen die Werte bei Hepatitis "im mittleren Normbereich" (51). Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Kollagenpeptidaseaktivitätsbestimmung zur Differentialdiagnose chronischer Lebererkrankungen im Parenchym war der Enzymspiegel im Serum bei chronisch aggressiven Hepatiden und manifesten Cirrhosen signifikant erhöht (69). Der geschilderte Abfall der Kollagenpeptidaseaktivität in CCl_4 -geschädigten Rattenlebern konnte nach einer Latenz von 14 Tagen auch im Serum beobachtet werden. Entgegen der Normalisierung in der Leber nach Absetzen der Begasung war die signifikante Abnahme der Aktivität im Serum nach 14 Tagen weiterhin meßbar (86).

Die erhöhte Kollagenpeptidaseaktivität im Serum von an Sarkoidose erkrankten Personen ließ sich durch eine Kortikosteroidmedikation in einer Reihe von Fällen rasch zur Norm zurückführen (216,217). Wahrscheinlich läßt die Aktivitätsmessung hier sogar prognostische Schlüsse zu (168). Die bei 150 Patienten mit verschiedenen dermatologischen Erkrankungen in 21% der Fälle gemessene Erhöhung der Enzymaktivität gab keinen Hinweis für eine Korrelation zu bestimmten Hautkrankheiten. Auffälligerweise galt dies auch für die Sklerodermie und für andere Kollagenosen (118). Keine Änderungen der Peptidaseaktivität er-

gaben, wie bereits erwähnt, Untersuchungen im Serum von Patienten mit degenerativen und entzündlichen Gelenkserkrankungen (215).

Faßt man die unter pathologischen und physiologischen Zuständen in verschiedenen Organen und im Serum beobachteten Veränderungen zusammen, so zeigt sich, daß größtenteils Aktivitätserhöhungen gemessen wurden. Diese Befunde über erhöhte Kollagenpeptidaseaktivitäten entsprechen weitgehend den Vorstellungen über die möglichen Aufgaben dieser Enzyme im Kollagenstoffwechsel. Dies wird augenfällig am Verhalten in Invasionszonen von Tumoren, in denen die Peptidasen zusammen mit anderen kollagenolytischen Enzymen die Ausbreitung des Tumors in das umliegende Gewebe ermöglichen. Auch ist verständlich, daß ein starker Kollagenumsatz ebenso wie eine rasche Involution eines Organs, z.B. des Uterus, eine gesteigerte Aktivität der abbauenden Enzyme erfordert. Ebenso entspricht die Aktivitätserhöhung bei destruierenden Gelenkaffektionen diesen Vorstellungen.

Die Verminderungen lassen sich in den Fällen der antirheumatischen oder immunsuppressiven Therapien als Rückführung zur Norm einer zuvor erhöhten Aktivität erklären. Die Aktivitätsabnahme nach Behandlung mit einem Ovulationshemmer, welcher die Abnahme des DNS-Gehaltes entsprach, dürfte durch eine gleichzeitige Zunahme von unspezifischen Proteinen

bedingt sein (185). Der nicht unwidersprochene Aktivitätsrückgang mit zunehmendem Alter des Organismus geht der altersbedingten Abnahme des gesamten Kollagenumsatzes parallel.

Schwieriger ist die Interpretation der Veränderungen bei Lebererkrankungen. So bleibt die Frage, ob die Aktivitätssteigerung bei Cirrhosen auf eine vermehrte Enzymfreisetzung oder auf eine Abbaustörung zurückzuführen ist, unbeantwortet (51). Gegen die erstere Annahme spricht zwar die Tatsache, daß der Kollagenpeptidasegehalt in Organen von gesunden Kaninchen in der Leber am geringsten ist (146), andererseits ist aber der Kollagenumsatz in fibrotischen Lebern gesteigert (187). Anderen Autoren (69, S.330) "erscheint der Schluß berechtigt, daß die Serumkollagenpeptidase nicht wesentlich durch nekrotische Leberzellprozesse beeinflusst wird". Es könne dagegen für die chronisch aggressive Hepatitis diskutiert werden, ob durch das Eindringen kollagener Fasern in das Cytoplasma der Leberparenchymzellen eine erhöhte Peptidaseaktivität ausgelöst werde, die sich anschließend auch im Serum kussere. Dem ist entgegenzuhalten, daß die chronisch aggressive Hepatitis durch sogenannte Mottenfraßnekrosen ausgezeichnet ist (44). Die andererseits gemessenen Aktivitätsminderungen werden dagegen mit einer Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen Auf- und Abbauvorgängen von Kollagen in der Leber zugunsten des Aufbaues bei Cirrhosen erklärt.

Die Prednisolonanwendung soll zu einer gleichmäßigen Hemmung von Auf- und Abbau und somit ohne Gleichgewichtsverschiebung zu einer Aktivitätsminderung führen (55). Allerdings soll der Abbau von Kollagen in der Leber Cortisonacetat-behandelter Ratten nach einem anderen Bericht zunehmen (85). Eine Erklärung für die Zusammenhänge zwischen der Kollagenpeptidaseaktivität in der Leber und im Serum nach CCl_4 -Vergiftung wird nicht diskutiert (86). Da CCl_4 die Proteinsynthese hemmt, könnte die Produktion der Kollagenpeptidase beeinflusst werden. Die geschilderten Widersprüche rühren sicherlich teilweise daher, daß das experimentelle Bild einer Cirrhose mit unterschiedlichen Mitteln dargestellt wurde, und damit die erzeugte Fibrosierung (diffuse, septale Form) variiert. Ein Vergleich der Enzymaktivitäten und der Hydroxyprolinausscheidung scheint zur Klärung der Differenzen ungeeignet, da der geringe Kollagengehalt der Leber nicht zum ausgeschiedenen Hydroxyprolin beiträgt (106).

Eine endgültige Einordnung sämtlicher Befunde ist schwierig, weil es sich bei den untersuchten Enzymen um eine sehr komplexe Gruppe handelt. So schwanken die Angaben über die pH-Optima von pH 7,2 bis pH 9. Auch kann der Wirkort der Kollagenpeptidasen bisher nicht eindeutig angegeben werden (57). Die Zuordnung des Kollagenabbaues zum Intra- oder Extrazellulärraum (77,78,240) ist ebensowenig gesichert, wie Klarheit über die Zuordnung

der Peptidase zu verschiedenen intrazellulären Kompartimenten besteht (86). In Aufbereitungen von Rattenleberzellen fanden sich Aktivitäten in der inneren Matrixmembran von Mitochondrien mit einem pH-Optimum bei pH 7,2 (83). Demgegenüber wurde die Peptidyl-Peptid Hydrolase im Lysosomensediment bzw. Lysosomensedimentüberstand von Leberhomogenaten weiblicher Ratten lokalisiert. Auch erfolgte der Nachweis in isolierten Lysosomen von Rinderleukocyten, jedesmal bei einem pH-Optimum von pH 8,0 bis pH 8,5 (185). Die Freisetzung gebundener Kollagenpeptidasen aus Lysosomen gestaltete sich aber wesentlich schwieriger als die anderer Enzyme (86). Somit "ist es unwahrscheinlich, daß Enzyme, die auf die apolaren Regionen wirken, lysosomalen Ursprungs sind" (54, S.124). Die Kollagenpeptidaseaktivität mit 2 pH-Optima bei pH 7,2 und bei pH 8,0 verteilte sich in Homogenaten verschiedener Rattenorgane nach Zentrifugation mit 100.000 g über 1 h entweder zu 40% im Überstand und zu 60% im Sediment (86), oder blieb fast ausschließlich im Überstand (60). Im Homogenat von Knochenzellen kam Kollagenpeptidaseaktivität im 700 g-Sediment vor (1).

Andere Autoren konnten bei Untersuchungen von Hepatocyten über die "selbstverständlich intrazelluläre Lokalisation" hinaus keine genauere Zuordnung zu den Zellorganellen vornehmen (51, S.163). Auch die Beobachtung, daß die (lysosomale) β -Glucuronidase bei

Cirrrosen abfiel und bei chronischen Hepatitiden anstieg (199), sich die Kollagenpeptidase im ersten Fall also antiparallel und im zweiten Fall parallel bewegte, ist auf der Suche nach dem Sitz der Peptidase schwer verwertbar, da sich lysosomale Enzyme z.B.

bei der chronischen Hepatitis ohnehin nicht einheitlich verhalten (188). Bei Patienten mit Sarkoidose zeigte außerdem die saure Phosphatase - im Gegensatz zur Kollagenpeptidase - im Serum immer normale Aktivitäten (168,217).

Die Kollagenpeptidaseaktivitäten mit den pH-Optima bei pH 7,2 und bei pH 8,0 änderten sich unter verschiedenen Bedingungen jeweils gleichsinnig (55,56), auch wenn die Aktivitätsverteilung der Isoenzyme im Serum je nach untersuchter Person unterschiedlich war (57). Weitere Untersuchungen ergaben, daß das zweite pH-Optimum bei pH 8,0 immer erst 8 h bis 4 d nach Blutentnahme auftrat. Dies wurde als eine in vitro stattfindende Aktivierung gedeutet. Außerdem sollen sich die K_m -Werte mit $0,842 \pm 0,074 \times 10^{-3}$ mol/l für pH 7,2 und $2,739 \pm 0,285 \times 10^{-3}$ mol/l für pH 8,0 signifikant unterscheiden (69). Im Gegensatz zum menschlichen Serum soll im Rattenserum nur ein pH-Optimum bei pH 7,2 existieren (86). Eine Übersicht über einige bisher isolierte Kollagenpeptidasen findet sich in (57): Danach unterscheidet sich nicht nur die jeweils angewandte Isolationsmethode, auch die Mitteilungen über die Eigenschaften der Enzyme

differieren stark: Die Michaelis-Konstante liegt in einem Bereich von 1×10^{-5} mol/l bis $2,7 \times 10^{-4}$ mol/l, das Molekulargewicht beläuft sich auf Werte von 46.000 bis 180.000 und das Temperaturoptimum beträgt für ein Enzym sogar 45° C.

Als nächstes soll die Wirkungsweise der verfütterten Medikamente erläutert werden:

Die Wirkung von Kortikosteroiden auf den Kollagenstoffwechsel beruht einmal auf der hormonellen Beeinflussung der Fibroblasten. Entsprechend der allgemein "eiweißkatabolen" Wirkung dieser Substanzgruppe (129) führte sie zu einer Verminderung der Zahl (228) und des Wachstums (27) dieser Bindegewebszellen (35). Andere Autoren konnten jedoch diese morphologischen Veränderungen nicht bestätigen (150,178,212). Unbestritten ist dagegen eine von der Dosis und dem verwendeten Kortikosteroid (231) abhängige Einschränkung der intrazellulären Kollagenbildung (26,45,106), wobei die Lokalisation des betrachteten Bindegewebes von Bedeutung ist (153). Ähnliche Befunde wurden auch für die Produktion der Grundsubstanz erhoben (152,208,209,210). Spezifische Wirkungen auf das extrazelluläre Kollagen ließen sich mit physikalischen Untersuchungsmethoden nachweisen: So fand sich eine erhöhte Bruchfestigkeit des Diaphysenschaftes und eine erhöhte Reißfestigkeit der Epiphysenfuge an Knochen von kortikosteroid-behandelten Ratten (229,232,233,234).

Die zugrunde liegenden Veränderungen im molekularen Bereich erhellen Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen (110,122,193): Danach kommt es unter Kortikosteroidbehandlung von Ratten zu einer Abnahme der NLK-Fraktion (68,88,89,125,205). Die SLK-Fraktion fällt nach anfänglicher Erhöhung auch ab (117). Gleichzeitig liegen ULK und Gesamtkollagen trotz vermindelter Syntheserate vermehrt vor (92,152). So muß also eine beschleunigte Faserreifung angenommen werden. Die Verminderung der CLP-Werte (142,167) und des Hydroxyprolins im Serum (110,131) sowie des ausgeschiedenen Hydroxyprolins im Urin (80,109) sind als Zeichen eines verminderten Abbaues reifen Kollagens zu werten. Auch führt die gebremste Syntheserate zu einer Senkung dieser Parameter (130,231), so daß das Verhältnis : Hydroxyprolin aus dem Abbau unlöslichen Kollagens zu Hydroxyprolin aus dem Abbau neu entstandenen Kollagens der Norm von 2:1 (189) entspricht (106). Die Erhöhung des Vernetzungsgrades der Fibrillen entspricht ausserdem den Veränderungen, die auch im Alter gefunden werden (195).

In der Literatur liegen bezüglich der quantitativen Veränderungen der einzelnen Kollagenfraktionen auch von den oben geschilderten abweichende Ergebnisse vor, welche dementsprechend mit einer unterschiedlichen Auffassung von der Wirkung der Kortikosteroide verbunden werden.

So soll schon 2 h nach i.p. Kortikosteroidapplikation die SLK-Fraktion in der Haut junger Ratten vermehrt vorgelegen haben, im Gegensatz zu den anderen Kollagenfraktionen, die reduziert waren (90). Dies soll durch die Induktion kollagenolytischer und proteolytischer Fermente durch eine kortikosteroidgesteuerte Repression eines Operons verursacht sein (91). Die Enzyme sollen cytoplasmatischen, nicht lysosomalen Ursprungs sein (90). Das schnelle Ansprechen auf Kortikosteroide wurde jedoch in Frage gestellt (130), auch wenn "für einige Formen des Kollagens" (231, S. 2164) eine Abbausteigerung für möglich gehalten wurde (130). Im Bindegewebe der Leber junger Ratten fand sich andererseits eine Verringerung aller Kollagenfraktionen nach täglicher Kortikosteroidinjektion (i.m.) über 5 Tage (85). Neben der verringerten Kollagensynthese sollen Kortikosteroide zu einer Induktion lysosomaler und nuclearer unspezifischer kollagenolytischer Fermente (84) führen, welche lösliches, jedoch nicht unlösliches Kollagen verdauen. Dem stehen wieder Befunde gegenüber, nach denen Kortison eine membranstabilisierende Wirkung hat (238). Dabei soll durch eine direkte Wechselwirkung mit den Membranlipiden vor allem die Verschmelzung der Phagosomen mit den Lysosomen zu Phagolysosomen verhindert werden (237). Diese Ergebnisse sind auch an experimentellen Modellsystemen belegt (5). Weitere Autoren fanden eine Verstärkung der Kollagenproteasen (20) und bakteriellen Kollagenasen (105) durch Kortikosteroide. Schließlich liegt noch eine

Untersuchung vor, nach der alle Kollagenfraktionen auch in der Rattenhaut unter Kortikosteroiden abnehmen (23).

Mit dem Samen verschiedener Spezies der früher in mediterranen Gebieten als Futterpflanzen angebauten Leguminosen der Gattung *Lathyrus* stehen Drogen zur Verfügung, durch die eine Umsatzsteigerung des Kollagenstoffwechsels möglich ist. Als wirksames Prinzip aus *Lathyrus odoratus* (wohlriechende Platterbse oder -Wicke, engl.: sweat pea, franz.: jarosse) wurde vor allem beta-Aminopropionitril (BAPN, $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CN}$) erkannt (4,235). Außerdem erzeugen noch eine Reihe verwandter Verbindungen (Übersicht s. 8) wie Aminoacetonitril ($\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CN}$), Isonikotinsäurehydrazid und Semikarbazid das als Osteolathyrismus (202) bezeichnete Krankheitsbild. Dies äußert sich in seiner experimentell erzeugten Form bei der Verfütterung von BAPN an Laboratoriumstiere in Abhängigkeit von Spezies und Stamm (8,180) in Unterwuchs, Skelettdeformitäten, Schwächung und Aufweichung von Sehnen, Haut und Knorpel und dissezierenden Gefäßschäden ("Angiolathyrismus", dieser geht wahrscheinlich auf eine gestörte Elastinsynthese zurück 50) (28,34,82). Neuerdings wurden auch teratogene Schäden beobachtet (9). Die Berichte über eine verzögerte Wundheilung und verringerte Wundfestigkeit sind widersprüchlich (29,41). Histologisch fand sich eine Verminderung der Zahl der Osteoblasten und Osteocyten in Knochen und Kallus lathyritischer Tiere (12,15,186). Eine dosis-

abhängige Vergrößerung von Zellkernen des intraalveolären Zahnhalteapparates wurde als Zeichen einer gehemmten Proteinsynthese gedeutet (171).

Die auf molekularer Basis zu beobachtende Vermehrung der neutralsalzlöslichen Kollagenfraktion auf das 2- bis 3-fache der Norm (31, 67, 121, 125, 143, 160), folgt einmal aus einer Beschleunigung der Kollagensynthese, nachgewiesen an einem schnelleren Einbau von ^{14}C -Glycin in das NLK und zum anderen aus dem verzögerten Übergang von NLK in das SLK und ULK (123, 230). Für letztere Tatsache wird eine Blockierung der intra- (156) und intermolekularen (123, 154) Quervernetzung angeschuldigt. Physikalische Untersuchungen an gelöstem Kollagen aus der Haut lathyritischer Tiere führten zu entsprechenden Ergebnissen (28, 176). Zur Blockierung der Quervernetzung kommt es durch die Anlagerung von BAPN an das aktive Zentrum einer Cu-haltigen Lysyloxydase (24, 179, 204). Diese wird für die oxydative Desaminierung spezifischer Lysin- oder Hydroxylysinreste in das epsilon-semialdehyd bzw. das gamma-hydroxy-epsilon-semialdehyd der alpha-Aminoadipinsäure (Allysin oder Hydroxyallysin) verantwortlich gemacht (203). Diese Umwandlung erlaubt normalerweise Quervernetzungen im Sinne einer Aldolkondensation oder auch die Bildung von weniger stabilen En-Aminen (8, 16, 17, 18, 19). Weitere Möglichkeiten der Blockierung bestehen in der Bildung von En-Aminen oder Aldolkondensaten aus BAPN und seinen Metaboliten und Lysin- bzw. Hydroxylysinresten oder Allysin bzw.

Hydroxyallylsin. Dadurch wird entweder die oxydative Desaminierung verhindert oder/und die Kondensation der Querverbindungen wird unterbunden (16,179). In vitro läßt sich die Störung der Quervernetzung durch Inkubation von Kollagen mit Thiolverbindungen erreichen, dies bewirkt eine schnellere Verdauung der Fibrillen durch lysosomale Enzyme (3). Die Anlagerung von BAPN an das Kollagen wird im Sinne eines Antimetaboliten verstanden (2). Möglicherweise führt zusätzlich ein verstärkter indirekter Abbau des unlöslichen Kollagens über das NLK zu einer Erhöhung dieser Fraktion (164).

Dem erhöhten Angebot an NLK entspricht jedenfalls ein verstärkter Abbau, da ja gerade diese Fraktion mit der geringsten Quervernetzung dem proteolytischen Angriff ausgesetzt ist (65, 120,173). Hinzu tritt eine beim Lathyrismus verstärkte Aktivität von Kathepsin (87) und Leucinaminopeptidase (166), welche durch Prednison wieder aufgehoben werden kann (87). Entsprechend einem Fließgleichgewicht ist auch der CLP-Gehalt, das freie und peptidgebundene Hydroxyprolin im Serum (167) und die Hydroxyprolinausscheidung im Urin erhöht (81,96,155,164, 177).

Zusammengefaßt ergibt sich, daß der Kollagenstoffwechselsunter einer Kortikoidmedikation verlangsamt abläuft. Umgekehrt kommt es durch die Anwendung von BAPN zu einer Steigerung des Umsatzes. Bezüglich der Syntheseveränderungen herrscht in der Literatur weitgehende Einigkeit.

Dagegen kommen einige Untersucher zu dem Schluß, daß der Abbau durch Kortikosteroide nicht gebremst, sondern im Gegenteil beschleunigt wird. Damit ist angedeutet, daß ein exakter Vergleich der Versuche zur Wirkung einer Substanzgruppe auf das Bindegewebe und natürlich um so mehr der Vergleich verschiedener Wirkstoffe dann schwierig oder unmöglich ist, wenn die Versuchsbedingungen im Hinblick auf Dauer, Applikationsart, verwendete Arzneispezialität, Versuchsobjekt und untersuchtes Gewebe oder Gewebsfraktion variieren (145). Somit dürften auch die Widersprüche im Verhalten der kollagenolytischen Enzyme bzw. der Kollagenpeptidase mindestens teilweise in unterschiedlichen Versuchsbedingungen zu suchen sein. Die Überlegung gilt gleichermaßen für den Vergleich zwischen der Kollagenpeptidaseaktivität und dem Hydroxyprolin im Serum bzw. der Hydroxyprolinausscheidung im Urin.

Die Zusammenhänge zwischen der Hydroxyprolinausscheidung und der Aktivität der Kollagenpeptidase können nach den eigenen Experimenten, jedenfalls im Hinblick auf das Verhalten im Serum, nicht so klar interpretiert werden, wie die Befunde von GRIES (55), wonach die Aktivität der Kollagenpeptidase mit der Hydroxyprolinausscheidung korrespondiert:

Die Hydroxyprolinausscheidung ist bei lathyrischen Ratten als Ausdruck eines gesteigerten Kollagenabbaues erhöht (96, 155, 164, 177), wie andererseits die Abnahme des Hydroxyprolins im Serum und im Urin von kortikosteroidbehandelten Ratten (109, 110, 131) bzw. Patienten (80)

die objektiven Zeichen eines verminderten Kollagenabbaues sind. Unter Bedingungen, die weitgehend denen der eigenen Untersuchung gleichen, korrelierte außerdem die Höhe des CLP im Serum mit dem Kollagenumsatz (200). Signifikante Unterschiede der Kollagenpeptidaseaktivität im Serum zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen, also eine Abhängigkeit vom Kollagenumsatz, ließ sich dagegen durch die hier vorliegende Arbeit nicht auffinden. Weitere Beispiele für eine solche Diskrepanz liegen aus der Literatur vor.

Pathophysiologisch wird bei der Sarkoidose ein erhöhter Kollagenumsatz angenommen, was sich auch in den Befunden über eine erhöhte Kollagenpeptidaseaktivität abzeichnete (216,217). Dagegen liegen von der Hydroxyprolinausscheidung widersprüchliche Meßergebnisse vor. So soll einerseits die Ausscheidung erhöht sein, wie dies bei der Annahme eines gesteigerten Kollagenmetabolismus nach den dargelegten Vorstellungen gefordert werden muß (157). Andererseits sind Messungen veröffentlicht, nach denen die Ausscheidungsrate nicht erhöht ist (131,206). Eine Erklärung der differenten Ergebnisse böte die Annahme einer unterschiedlichen Vorbehandlung der Patienten (168).

Die Befunde an Patienten mit rheumatoider Arthritis lassen ebenfalls keine Kongruenz erkennen: Der Konstanz des Serumenzymspiegels (215) steht ein je nach Untersucher unterschiedliches Verhalten des Hydroxyprolins

gegenüber: Das Plasma-Hydroxyprolin war leicht erhöht (206) oder im Normbereich (131) und die totale Hydroxyprolinausscheidung im Urin in 3 von 4 Fällen im Normbereich, im 4. Fall leicht erhöht (131) oder, bei Kindern im Alter von 7 bis 14 Jahren, erniedrigt (30). Letzteres soll durch das gestoppte Wachstum während der aktiven Krankheitsphase verursacht sein.

Die Hydroxyprolinausscheidung im Urin weist eine deutliche Altersabhängigkeit auf (131,206), wie auch die Serum- bzw. Plasmaspiegel des freien und peptidgebundenen Hydroxyprolin (131) und des CLP (200) eine Abhängigkeit zumindest vom Lebensabschnitt (206) des betrachteten Individuums erkennen lassen. Die Veränderungen der NLK-Fraktion des Bindegewebes korrelieren hiermit (62). In dieses Bild passen die Meßergebnisse, die nach einem Maximum bei 30- bis 40-jährigen Probanden einen Abfall der Kollagenpeptidaseaktivität ausweisen (59). Zwei Arbeitsgruppen (51,118) kommen jedoch zu dem Ergebnis, daß eine Altersabhängigkeit des Enzymspiegels nicht besteht.

Eine Erklärung der im Rahmen dieser Untersuchung erhobenen Befunde bietet die Annahme, daß der Übertritt der Kollagenpeptidase ins Serum der Ausdruck einer Zellschädigung bzw. Permeabilitätssteigerung von Zellmembranen ist. Damit muß gefordert werden, daß der Kollagenabbau, über dessen genaue Lokalisation wie oben ausgeführt keine eindeutige Klarheit herrscht, zumindest auf der Stufe der Pepti-

dasewirkung intrazellulär abläuft. Daß nämlich intrazelluläre Aktivitätsänderungen nicht unbedingt solche im Serum nach sich ziehen, ist bewiesen : Bei Untersuchungen an Patienten mit rheumatoider Arthritis blieb der Enzymspiegel im Serum und in der Synovialflüssigkeit trotz Anstieg in der Synovialschleimhaut normal (215). Befunde an gelenkfernen Organen unterstreichen, daß es sich bei der rheumatoiden Arthritis dennoch sicher nicht um eine nur am Gelenk angreifende Störung des Kollagenstoffwechsels handelt (56,146). Andererseits ist die erhöhte Aktivität lysosomaler Enzyme in der Synovialflüssigkeit nicht unbedingt als Zeichen einer Schädigung normaler (Lysosomen-) Membranen zu sehen (236). Geht man also davon aus, daß die in den hier referierten Versuchen angewandten Medikamente in ihrer Wirkung zwar auf das Bindegewebe zielen, jedoch nicht zu einer spezifischen Zellschädigung im Sinne einer gesteigerten Permeabilität für die Kollagenpeptidase führten, so erklärt sich die beobachtete Konstanz des Serumenzymspiegels zwanglos.

Eine Erhöhung der Peptidaseaktivität im Serum ist dann denkbar, wenn neben einem gesteigerten Kollagenmetabolismus die Durchlässigkeit der für den Abbau maßgeblichen Zellen bzw. Zellorganellen für die Peptidase erhöht ist. So bestand in Medien von Fibroblastenkulturen eine Parallelität zwischen der Peptidaseaktivität und der Aktivität lysosomaler Hydrolasen, welche als Indikator der durch die Präparation

hervorgerufenen mechanischen Zellschädigung angesehen werden (225). Diese Vorstellungen treffen auch auf die mitgeteilten Aktivitätssteigerungen bei chronisch aggressiven Hepatitiden zu (69), welche sich histologisch durch aktive bindegewebige Septen und sogenannte Mottenfraßnekrosen auszeichnen (44). Ganz entsprechend wurden in Fällen akuter Hepatitiden, in denen lediglich der Untergang des Parenchyms im Mittelpunkt des pathologischen Geschehens steht, weder im Homogenat noch im Serum wesentlich erhöhte Aktivitäten nachgewiesen (51,199).

Die hohen Aktivitäten bei Sarkoidosepatienten lassen sich dagegen nicht durch eine grobe Zellschädigung erklären, wie erwähnt bewegen sich bei dieser Krankheit lysosomale Enzyme im Normbereich (168,216,217). Vielmehr muß hier die Störung des Kollagenstoffwechsels die Zellen differenzierter treffen, die Erhöhung mehr Ursache denn Reaktion sein.

Neben diesen Vorstellungen über das Verhalten der Kollagenpeptidase im Serum seien noch folgende Überlegungen angeführt:
Enzymatische Reaktionen laufen in biologischen Systemen im allgemeinen mit Substratkonzentrationen ab, die in der Nähe der Michaelis-Konstanten liegen, also weit vom Zustand der Substratsättigung entfernt sind, so daß die Reaktionsgeschwindigkeit durch die Substratkonzentration bestimmt wird (21). Somit erfolgt die Regelung einer Synthese- oder Abbaukette

nach Limitierung durch ein "Schlüsselenzym" entsprechend dem jeweiligen Substrat- oder Produktangebot. Offenbar funktioniert die Kollagenprotease als limitierender Faktor des Kollagenabbaues (174). Daher besteht also prinzipiell für die Kollagenpeptidasen, welche den 3. Schritt des Kollagenabbaues katalysieren, trotz Änderung des Kollagenmetabolismus - zumindest in physiologischen Grenzen - nicht notwendigerweise ein Grund zur Aktivitätsänderung. Weiter konnte eine Produkthemmung der Peptidase durch Tripeptide der allgemeinen Struktur Gly-Pro-X, z.B. Gly-Pro-Ala, nachgewiesen werden (220,224,225). Gly-Hyp-Hyp, eine Sequenz, die nicht im Kollagen vorkommt, war dagegen unwirksam. Diese Befunde unterstreichen die Möglichkeit einer solchen Regelung. Schließlich wurde in Kulturen von Knochenzellen aus Hühnerembryonen und von Mäusefibroblasten noch eine Steuerung der Kollagenpeptidase im Sinne der sehr komplexen Kontaktinhibition angenommen (219,226).

VI. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivität der Kollagenpeptidase im Serum junger Ratten nach Beeinflussung des Kollagenstoffwechsels durch orale Applikation der bindegewebswirksamen Substanzen beta-Aminopropionitril (BAPN) und Prednisolon - auch in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer - untersucht. Parallel dazu erfolgte die Messung im Serum unbehandelter Ratten.

Der Vergleich der Meßergebnisse ließ weder nach 14- noch nach 28-tägiger Fütterung einen signifikanten Unterschied der Kollagenpeptidaseaktivität im Serum behandelter und unbehandelter Ratten erkennen. Diese Befunde wurden den in der Literatur veröffentlichten Beobachtungen über das Verhalten der Kollagenpeptidase beim Menschen und bei Tieren in verschiedenen Organen und im Serum unter physiologischen und pathologischen Zuständen gegenübergestellt. Weiter wurden die Wirkungen des Lathyrogens BAPN und des Kortikosteroids Prednisolon in die Betrachtung einbezogen.

Aufgrund dieser Überlegungen ist festzustellen, daß der Serumenzymspiegel der Kollagenpeptidase weniger über den aktuellen Kollagenumsatz auszusagen vermag als der Enzymspiegel in Gewebshomogenaten. Doch kann auch da "die Aktivität des Enzyms uns nicht erlauben, irgendwelche gesicherten Schlüsse über den Substratumsatz zu ziehen" (55, S.601). Damit ersetzt die Bestimmung der Kollagenpeptidase im Serum für einen Einblick in die aktuelle Bilanz des Kollagenhaushaltes zunächst nicht die Methoden, welche direkt die Produkte des Kollagenmetabolismus untersuchen (Collagen-like Protein (CLP), Hydroxyprolin im Serum bzw. Plasma und Hydroxyprolinausscheidung im Urin). Dies schließt jedoch nicht aus, daß die Messung zur Diagnostik und Verlaufskontrolle verschiedener Bindegewbserkrankungen, bei denen die Kollagenpeptidaseaktivität im Blutserum u.U. ursächlich erhöht ist, große Bedeutung besitzt. Welche Faktoren für eine derartige Verschiebung der Aktivität verantwortlich zu machen sind, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

111. Tabeljen

Tierkäfig Nr.	Anfangs- gewicht	Lfd. Nr.	Endge- wicht
1	106	1	104
	107	2	151
	107,5	3	153
2	102	4	130
	104,5	5	151
	115	6	147
3	102	7	125
	105,5	8	160
	109,5	9	125
4	96	10	125
	102	11	178
	116	12	140
5	91	13	146
	104,5	14	134
	107	15	138

Tab. 2

Anfangs- und Endgewicht der Kontrolltiere sowie deren Aufteilung innerhalb der Gruppe 1.
Gewichtsangabe in Gramm.

Tierkäfig Nr.	Anfangs- gewicht	Lfd. Nr.	Endge- wicht
1	93,5	1	157
	100	2	194
	105	3	175
2	92,5	4	173
	99,5	5	160
	104	6	165
3	93,5	7	155
	96	8	145
	96,5	9	155
4	86,5	10	132
	88	11	171
	102	12	182
5	73	13	166
	77	14	161
	85	15	*

* siehe Tab. 10

Tab. 3

Anfangs-und Endgewicht der Kontrolltiere sowie deren Aufteilung innerhalb der Gruppe 2.
Gewichtsangabe in Gramm.

Herküf- Nr.	Anfangs- gewicht	Lfd. Nr.	Endge- wicht
1	107	1	139
	107	2	140
	114	3	141
2	103	4	138
	107	5	142
	110	6	145
3	103	7	134
	106	8	130
	110	9	140
4	90	10	160
	94	11	150
	124,5	12	130
5	90	13	149
	100	14	138
	111	15	129

Tab. 4

Anfangs- und Endgewicht der BAPN-Ratten sowie deren
Aufteilung innerhalb der Gruppe 3.
Gewichtsangabe in Gramm.

Tierkäfig Nr.	Anfangs- gewicht	Lfd. Nr.	Endge- wicht
1	99,5	1	173
	103	2	194
	109	3	199
2	96	4	149
	102	5	161
	103	6	144
3	95,5	7	164
	97	8	158
	99,5	9	155
4	86,5	10	141
	88	11	181
	89	12	106
5	69	13	143
	76	14	132
	90	15	130

Tab. 5

Anfangs- und Endgewicht der BAPN-Ratten sowie deren Aufteilung innerhalb der Gruppe 4.

Gewichtsangabe in Gramm.

Tierkäfig Nr.	Anfangs- gewicht	Lfd. Nr.	Endge- wicht
1	104	1	109
	108,5	2	113
	110	3	92
2	90,5	4	103
	112,5	5	107
	115	6	114
3	84,5	7	118
	105,5	8	103
	122	9	130
4	96	10	100
	104	11	127
	100,5	12	114
5	91	13	110
	92	14	120
	110	15	*

* siehe Tab. 13

Tab. 5

Anfangs- und Endgewicht der Prednisolon-Ratten sowie deren Aufteilung innerhalb der Gruppe 5. Gewichtsangabe in Gramm.

Tierkäfig Nr.	Anfangs- gewicht	Lfd. Nr.	Endge- wicht
1	96	1	106
	100,5	2	122
	109	3	124
2	95	4	120
	98	5	123
	103	6	114
3	94	7	120
	96	8	110
	102	9	120
4	100	10	120
	103,5	11	102
	100	12	105
5	75	13	117
	89,5	14	100
	97	15	102

Tab. 7

Anfangs- und Endgewicht der Prednisolon-Ratten sowie deren Aufteilung innerhalb der Gruppe c. Gewichtsangabe in Gramm.

Lfd.Nr.	Extinktionen			
	0,5	1,0	1,5	2,0
1-3	0,074	0,149	0,227	0,320
4-9	0,079	0,150	0,230	0,295
10-15	0,070	0,142	0,214	0,322

Tab. 5

Extinktionen der Verdünnungsreihen zu den Messungen der Gruppen 1, 3, 5.

Eingesetzte Menge an Eichlösung in ml.

Lfd.Nr.	Extinktionen			
	0,5	1,0	1,5	2,0
1-3	0,086	0,174	0,242	0,320
4-6	0,002	0,162	0,252	0,325
7-9	0,070	0,150	0,247	0,310
10-12	0,074	0,151	0,234	0,296
13-15	0,072	0,153	0,230	0,320

Tab. 9

Extinktionen der Verdünnungsreihen zu den Messungen der Gruppen 2, 4, 6.

Eingesetzte Menge an Eichlösung in ml.

Lfd.Nr.	Extinktionen			Mittelwert der Extinktionen	Kollagenpeptidaseaktivität
1	0,070	0,009	0,070	0,0697	19,10
2	0,094	0,137	0,102	0,1110	30,41
3	0,114	0,105	0,113	0,1107	20,33
4	0,073	0,073	0,080	0,0753	20,63
5	0,062	0,076	0,062	0,0667	18,28
6	0,050	0,040	0,055	0,0483	13,23
7	0,050	0,021	0,069	0,0467	12,80
8	0,060	0,022	0,050	0,0440	12,06
9	0,070	0,058		0,0640	17,54
10*)	0,070	0,115		0,0925	25,34
11	0,127	0,123	0,114	0,1215	33,24
12	0,086	0,118	0,110	0,1047	28,69
13*)	0,100	0,097	0,146	0,1143	31,32
14	0,097	0,074	0,110	0,0937	25,67
15	0,088	0,085	0,087	0,0877	23,70

Tab. 10

Extinktionen, Mittelwert der Extinktionen und Kollagenpeptidaseaktivität in den Seren der Behandlungsgruppe 1. Angabe der Peptidaseaktivität in CU (μ mol Pz-Pro-Leu/1 Serum/h)

*) Diese Messungen wurden wegen starker Streuung der einzelnen Extinktionswerte nicht in den Vergleich zwischen den Behandlungsgruppen einbezogen.

LFZ.Nr.	Extinktionen		Mittelwert der Extinktionen	Kollagenpeptidaseaktivität
1*)				
2	0,012	0,014	0,0145	3,97
3*)	0,022	0,000	0,0450	12,23
4	0,002	0,000	0,0010	14,71
5	0,020	0,030	0,0250	6,35
6	0,015	0,021	0,0220	5,03
7	0,007	0,000	0,0055	1,78
8	0,020	0,010	0,0250	6,30
9	0,014	0,030	0,0200	7,12
10	0,004	0,049	0,0505	15,48
11	0,070	0,070	0,0730	20,00
12	0,054	0,060	0,0600	16,44
13	0,090	0,095	0,0925	25,34
14	0,040	0,058	0,0520	14,25
15*)				

Tab. 11

Extinktionen, Mittelwert der Extinktionen und Kollagenpeptidaseaktivität in den Seren der Behandlungsgruppe 2. Angabe der Peptidaseaktivität in CU (μ mol Pz-Pro-Leu/l Serum/h)

- *) Seren konnten aus äußeren Gründen nicht gewonnen werden.
- **) Diese Messung wurde wegen starker Streuung der einzelnen Extinktionswerte nicht in den Vergleich zwischen den Behandlungsgruppen einbezogen.

Lfd.Nr.	Extinktionen			Mittelwert der Extinktionen	Kollagenpeptidaseaktivität
1	0,040	0,020		0,0300	6,22
2*)	0,104	0,041		0,0725	19,06
3	0,009	0,002		0,0055	17,95
4	0,001	0,092	0,109	0,0940	25,76
5	0,097	0,070	0,078	0,0817	22,39
6	0,076	0,092	0,044	0,0707	19,37
7	0,077	0,083		0,0800	21,92
8	0,095	0,095		0,0950	26,03
9*)	0,060	0,140	0,077	0,0923	25,28
10	0,044	0,060	0,057	0,0537	14,71
11	0,071	0,050	0,065	0,0613	18,44
12	0,005	0,067	0,054	0,0020	10,99
13	0,072	0,091	0,094	0,0657	23,48
14	0,070	0,072	0,082	0,0747	20,47
15	0,040	0,024	0,052	0,0367	10,00

Tab. 12

Extinktionen, Mittelwert der Extinktionen und Kollagenpeptidaseaktivität in den Seren der Behandlungsgruppe 2. Angabe der Peptidaseaktivität in CU (μ mol Pz-Pro-Leu/1 Serum/h)

*) Diese Messungen wurden wegen starker Streuung der einzelnen Extinktionswerte nicht in den Vergleich zwischen den Behandlungsgruppen einbezogen.

Lfd.Nr.	Extinktionen		Mittelwert der Extinktionen	Kollagenpeptidaseaktivität
1	0,000	0,074	0,0770	21,10
2	0,000	0,003	0,0015	16,53
3	0,034	0,004	0,0740	20,28
4	0,034	0,042	0,0480	13,15
5	0,064	0,074	0,0690	18,91
6	0,033	0,032	0,0525	14,39
7	0,048	0,042	0,0430	12,33
8	0,066	0,063	0,0870	23,34
9*)	0,220	0,150	0,1850	50,69
10	0,072	0,075	0,0735	20,14
11	0,100	0,094	0,0970	20,58
12	0,080	0,075	0,0775	21,23
13	0,046	0,052	0,0490	13,43
14	0,038	0,034	0,0360	9,80
15	0,028	0,036	0,0320	8,77

Tab. 13

Extinktionen, Mittelwert der Extinktionen und Kollagenpeptidaseaktivität in den Seren der Behandlungsgruppe 4. Angabe der Peptidaseaktivität in CU (μ mol Pz-Pro-Leu/l Serum/h).

*) Diese Messung wurde wegen starker Streuung der einzelnen Extinktionswerte nicht in den Vergleich zwischen den Behandlungsgruppen einbezogen.

Lfd.Nr.	Extinktionen			Mittelwert der Extinktionen	Kollagenpeptidaseaktivität
1	0,047	0,015		0,0310	8,49
2**)	0,064	0,145		0,1045	28,63
3	0,064	0,061		0,0625	17,12
4	0,042	0,073		0,0575	15,75
5	0,058	0,064		0,0610	16,71
6	0,040	0,032		0,0360	9,86
7	0,050	0,056	0,054	0,0533	14,60
8	0,052	0,053		0,0525	14,39
9	0,060	0,040		0,0500	13,70
10	0,047	0,048	0,039	0,0477	12,25
11	0,036	0,054		0,0700	19,18
12	0,064	0,063		0,0625	17,40
13	0,062	0,064		0,0630	17,26
14	0,090	0,111		0,1035	28,31
15*)					

Tab. 14

Extinktionen, Mittelwert der Extinktionen und Kollagenpeptidaseaktivität in den Seren der Behandlungsgruppe 5. Angabe der Peptidaseaktivität in CU (μ mol Pz-Pro-Leu/1 Serum/h).

*) Serum konnte aus äußeren Gründen nicht gewonnen werden.

) Diese Messung wurde wegen starker Streuung der einzelnen Extinktionswerte nicht in den Vergleich zwischen den Behandlungsgruppen einbezogen.

Lfd.Nr.	Extinktionen		Mittelwert der Extinktionen	Kollagenpeptidaseaktivität
1	0,045	0,068	0,0565	15,48
2	0,044	0,036	0,0400	10,96
3*)	0,064	0,010	0,0470	12,88
4	0,030	0,033	0,0315	8,63
5	0,025	0,028	0,0265	7,26
6	0,040	0,024	0,0320	8,77
7	0,115	0,088	0,1015	27,81
8	0,052	0,054	0,0530	14,52
9	0,080	0,088	0,0840	23,02
10	0,050	0,026	0,0380	10,41
11	0,082	0,062	0,0720	19,73
12	0,058	0,075	0,0665	18,22
13*)	0,010	0,048	0,0290	7,95
14	0,033	0,012	0,0225	6,16
15	0,030	0,031	0,0305	8,36

Tab. 15

Extinktionen, Mittelwert der Extinktionen und Kollagenpeptidaseaktivität in den Seren der Behandlungsgruppe 6. Angabe der Peptidaseaktivität in CU (μ mol Pz-Pro-Leu/1 Serum/h)

*) Diese Messungen wurden wegen starker Streuung der einzelnen Extinktionswerte nicht in den Vergleich zwischen den Behandlungsgruppen einbezogen.

G r u p p e					
1		3		5	
Lfd.Nr.	Rangzahl	Lfd.Nr.	Rangzahl	Lfd.Nr.	Rangzahl
1	22	1	1	1	2
2	38	3	20	3	10
3	37	4	33	4	13
4	27	5	29	5	14
5	21	6	25	6	3
6	5	7	20	7	11
7	7	8	34	8	10
8	5	10	12	9	9
9	19	11	22	10	6
11	39	12	15	11	24
12	36	13	30	12	15
14	32	14	20	13	17
15	31	15	4	14	35
$N_1^{(*)}=13$	$T_1^{(**)}=323$	$N_2^{(*)}=13$	$T_2^{(*)}=179$	$N_3^{(*)}=13$	$T_3^{(**)}=170$
$T = 0,57$					

Tab. 1:

Muskal-Wallis-Test

Vergleich zwischen den 14-tägigen Behandlungsgruppen
1, 3, 5 mit Angabe des Wertes der Testgröße T

(*) Anzahl der Messergebnisse

(**) Summe der Rangzahlen

G r u p p e					
2		4		6	
Lfd.Nr.	Rangzahl	Lfd.Nr.	Rangzahl	Lfd.Nr.	Rangzahl
		1	33	1	22,5
2	2	2	26	2	15
4	25	3	32	4	10
5	6	4	17	5	8
6	3	5	28	6	11,5
7	1	6	20	7	39
8	5	7	16	8	21
9	7	8	36	9	35
10	22,5	10	31	10	14
11	30	11	38	11	29
12	24	12	34	12	27
13	37	13	18	14	4
14	19	14	13	15	9
		15	11,5		
$N_1^*)=12$	$T_1^{**})=181,5$	$N_2^*)=14$	$T_2^{**})=353,5$	$N_3^*)=13$	$T_3^{**})=245$
$T = 5,30$					

Tab. 17

Kruskal-Wallis-Test

Vergleich zwischen den 28-tägigen Behandlungsgruppen
2, 4, 6 mit Angabe des Wertes der Testgröße T

*) Anzahl der Messergebnisse

**) Summe der Rangzahlen

unverdanntes Serum			1:2 verdünntes Serum		
ΔE		$\overline{\Delta E}$	ΔE		$\overline{\Delta E}$
0,150	0,142	0,1465	0,036	0,026	0,0310
0,100	0,097	0,0985	0,064	0,081	0,0725
0,170	0,117	0,1435	0,062	0,062	0,0650
0,140	0,155	0,1475	0,060	0,041	0,0545

Tab. 18

Vergleich der Kollagenpeptidaseaktivität in unverdünnten Seren und in 1:2 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnten Seren, angegeben als Extinktion (ΔE) und errechneten Mittelwert ($\overline{\Delta E}$) der Aktivitätsmessung.

VIII. Literaturverzeichnis

1. Aer, J., and K.I. Kivirikko: Preliminary characterization of the collagenolytic activity of the rat bone. Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 350, 87-90 (1969)
2. Aleo, J.J., and A. Cammarata: Experimental lathyrism: inhibition of beta-alanine incorporation by beta-aminopropionitrile. Experientia (Basel) 27, 1161-1162 (1971)
3. Anderson, A.J.: Effects of lysosomal collagenolytic enzymes, antiinflammatory drugs and other substances on some properties of insoluble collagen. Biochem.J. 113, 457-463 (1969)
4. Bachhuber, T.E., J.J. Lailich, D.M. Angevine, E.D. Schilling, and F.M. Strong: Lathyrus factor activity of beta-aminopropionitril and related compounds. Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.) 89, 294-297 (1955)
5. Bangham, A.D., M.M. Standish, and G. Weissmann: The action of steroids and streptolysin S on the permeability of phospholipid structures to cations. J.molec.Biol. 13, 253-259 (1965)
6. Bannister, D.W., and A.B. Burns: Presence of collagenolytic activity in avian serum. Int.J.Biochem. 3, 216-224 (1972)

7. Barnes, M.J., B.J. Constable, L.F. Morton, and P.M. Royce: Age-related variations in hydroxylation of lysine and proline in collagen. *Biochem.J.* 139, 461-468 (1974)
8. Barrow, M.V., C.F. Simpson, and E.J. Miller: Lathyrism: a review. *Quart.Rev.Biol.* 49, 101-128 (1974)
9. Barrow, M.V., and L.S. Willis: Ectopia cordis (ectocardia) and gastroschisis induced in rats by maternal administration of the lathyrogen beta-aminopropionitril (BAPN). *Amer.Heart J.* 83, 518-526 (1972)
10. Bauer, E.A., A.Z. Eisen, and J.J. Jeffrey: Radio-immunoassay of human collagenase. Specificity of the assay and quantitative determination of in vivo and in vitro human skin collagenase. *J.biol.Chem.* 247, 6679-6685 (1972)
11. Bazin, S., and A. Delaunay: Role of cathepsins in granulation tissue. *J.dent.Res.* 51, 244-250 (1972)
12. Belanger, L.F.: Observations on the manifestations of osteolathyrism in the chick. *J.Bone.Jt.Surg.* 41-B, 581-589 (1959)
13. Bentley, J.P., and A.N. Hanson: The hydroxyprolin of elastin. *Biochim.biophys.Acta (Amst.)* 175, 339-344 (1964)
14. Böhmer, T.: The biosynthesis of collagen. *Acta rheum.scand.* 17, 209-222 (1971)

15. Bolognani, L., and I.V. Ponseti : Ca⁴⁵ uptake in fracture callus of normal and aminoacetone-nitril-treated rats.
Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.) 102, 933-935 (1962)
16. Bornstein, P.: The cross-linking of collagen and elastin and its inhibition in osteolathyrism. Is there a relation to the aging process ?
Amer.J.Med. 49, 429-435 (1970)
17. Bornstein, P., A.H. Kang, and K.A. Piez: The nature and localisation of intermolecular crosslinks in collagen.
Proc.nat.Acad.Sci. (Wash.) 55, 417-424 (1966)
18. Bornstein, P., and K.A. Piez: A biochemical study of human skin collagen and the relation between intra- and intermolecular crosslinking.
J.clin.Invest. 43, 1813-1823 (1964)
19. Bornstein, P., and K.A. Piez: The nature of the intermolecular cross-links. The separation and characterization of peptides from the cross-link region of rat skin collagen.
Biochemistry 5, 3460-3473 (1966)
20. Brown, S.I., C.A. Veller, and A.M. Vidrich: Effect of corticosteroids on corneal collagenase of rabbits.
Amer.J.Ophthal. 70, 744-747 (1970)
21. Buddecke, E.: Grundriss der Biochemie, 2. Auflage, Berlin: Walter de Gruyter u. Co. 1971
22. Burleigh, M.C., A.J. Barrett, and G.S. Lazarus: Cathepsin B₁: a lysosomal enzyme that degrades native collagen.
Biochem.J. 137, 387-398 (1974)

23. Cadavid, N.G., B. Leidermann, and R.E. Mancini: Action of glucocorticosteroids on dermal collagen fractions from new-borne to adult rats.
Acta physiol.lat.-amer. 14, 366-376 (1964)
24. Cetta, G., G. Gerzeli, A. Quartieri, and A.A. Castellani: Protective effect of flavonoids on the collagen of lathyratic rats.
Experientia (Basel) 27, 1046-1048 (1971)
25. Chvapil, M., and J. Hurych: Control of collagen biosynthesis.
Internat.Rev.Connect.Tissue Res. 4, 67-96 (1968)
26. Clark, J.: The effect of cortisone upon protein synthesis.
J.biol.Chem. 200, 69-76 (1953)
27. Cornman, I.: Selective damage to fibroblasts by desoxycorticosterone in cultures of mixed tissues.
Science 113, 37-39 (1951)
28. Craven, J.L.: The characterization of lathyrism in the experimental animal.
Arch.Path. 89, 160-163 (1970)
29. Craven, J.L.: Wound contraction in lathyratic rats.
Arch.Path. 89, 526-530 (1970)
30. Danelatos-Athanassiadis, C.T., N.S. Constantas, S. Agathopoulos, and S. Matsoniatis: Urinary free proline and collagen metabolites in newborn, healthy children and in collagen-diseases.
Clin.chim.Acta 23, 153-164 (1969)

31. Dasler, W., R.E. Stoner, and R.V. Milliser: Effect of osteolathyrism on soluble collagen fractions of rat connective tissue.
Metabolism 10, 883-886 (1961)
32. Dehm, P., and A. Nordwig: The cleavage of prolyl peptides by kidney peptidases. Partial purification of a "x-prolyl-aminopeptidase" from swine kidney.
Europ.J.Biochem. 17, 364-371 (1970)
33. Dehm, P., and A. Nordwig: The cleavage of prolyl peptides by kidney peptidases. Isolation of a microsomal carboxypeptidase from swine kidney.
Europ.J.Biochem. 17, 372-377 (1970)
34. Doerr, W., A.J. Rossner u. W. Schreil: Experimentelle Mesenchymschäden durch Lathyrus odoratus.
Langenbecks Arch.klin.Chir. 294, 426-449 (1960)
35. Dougherty, T.F., and D.L. Berliner: The effects of hormones on connective tissue cells, in: Treatise on collagen, Vol. 2: Biology of collagen, Part A, Gould, B.S. (Ed.)
London and New York: Academic Press 1968, pp. 367-394
36. Dresden, M.H.: Evidence for the role of collagenase in collagen metabolism.
Nature (Lond.) 231, 55-57 (1971)
37. Eisen, A.Z.: Human skin collagenase: localization and distribution in normal human skin.
J.invest.Derm. 52, 442-448 (1969)

38. Eisen, A.Z., E.A. Baer, and J.J. Jeffrey: Animal and human collagenases.
J.invest.Derm. 55, 359-373 (1970)
39. Eisen, A.Z., J.J. Jeffrey, and J. Gross: Human skin collagenase. Isolation and mechanism of attaction on the collagen molecule.
Biochim.biophys.Acta (Amst.) 151, 637-645 (1968)
40. Emmrich, R., H. Koch, M. Rödenbeck, H. Marek u. A. Ziegler: Mathematische Modellierung des Kollagenstoffwechsels. Tracerkinetische Untersuchungen mit ^3H -Prolin am Organbindegewebe gesunder Ratten.
Z.ges.inn.Med. 27, 685-693 (1972)
41. Enzinger, F.M., and E.D. Warner: Wound healing in experimental lathyrism.
Lab.Invest. 6, 251-258 (1957)
42. Espey, L., and P. Rondell: Collagenolytic activity in the rabbit and sow Graafian follicle during ovulation.
Amer.J.Physiol. 214, 326-329 (1968)
43. Evanson, J.M., J.J. Jeffrey, and S.M. Krane: Studies on collagenase from rheumatoid synovium in tissue culture.
J.clin.Invest. 47, 2639-2651 (1968)
44. Gedigk, P. u. H. Bechtelsheimer: Leber, in: Lehrbuch der Allgemeinen Pathologie und der Pathologischen Anatomie, Eder M. u. P. Gedigk (Hrsg.), 29. Auflage
Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1974,
S. 513-541

45. Gerarde, H.W., and M. Jones: The effect of cortisone on collagen synthesis in vitro.
J.biol.Chem. 201, 553-560 (1953)
46. Gerber, G.B., G. Gerber, and K.I. Altmann: Studies on the metabolism of tissue proteins. I. Turnover of collagen labeled with proline-U-C on young rats.
J.biol.Chem. 235, 2653-2661 (1960)
47. Gerber, G.B., G. Gerber, and K.I. Altmann: Studies on collagen-turnover in lathyrotic rats.
Arch.Biochem. 96, 601-604 (1962)
48. Giesecking, R.: Ultramorphologie.
Arch.Derm.Forsch. 244, 124-130 (1972)
49. Gould, B.S.: Collagen biosynthesis, in: Treatise on collagen, Vol.2: Biology of collagen, Part A. Gould, B.S. (Ed.)
London and New York; Academic Press, 1968, pp. 138-188
50. Grant, M.E., and D.J. Prockop: The biosynthesis of collagen.
New Engl.J.Med. 286, 291-300 (1972)
51. Grasedyck, K., D. Röpohl, F. Szarvas u. J. Lindner: Kollagenpeptidaseaktivität menschlicher Seren bei Lebercirrhose.
Klin.Wschr. 49, 163-164 (1971)
52. Grassmann, W., J. Engel, K. Hannig, H. Hörmann, K. Kühn u. A. Nordwig: Kollagen.
Fortschr.Chemie org.Naturst. 23, 195-314 (1965)

53. Green, H., and D. Hamerman: Production of hyaluronate and collagen by fibroblast clones in culture. Nature (Lond.) 201, p.710 (1964)
54. Gries, G.: The mechanism of collagen degradation, in: Rheumatoid Arthritis. Müller, W., H.G. Harwerth, and F. Fehr (Eds.) London and New York: Academic Press 1971, pp. 123-125
55. Gries, G.: Effect of prednisolone, stilboestrol and thioacetamide on the collagen peptidase activity in certain organs of the rat, in: Rheumatoid Arthritis, Müller, W., H.G. Harwerth, and K. Fehr (Eds.) London and New-York: Academic Press 1971, pp. 601-603
56. Gries, G.: Collagenpeptidase in serum and organs in experimental arthritis, in: Rheumatoid Arthritis. Müller, W., H.G. Harwerth, and K. Fehr (Eds.) London and New York: Academic Press 1971, pp. 165-167
57. Gries, G., H. Buresch, and L. Strauch: Collagenolytic enzymes in human serum. Experientia (Basel) 26, 31-33 (1970)
58. Gries, G. u. K. Grassedyck: Über spezifische Kollagenasen in Organen des Magen-Darmtraktes. Verh.dtsch.Ges.Path. 53, 205-209 (1969)
59. Gries, G. u. L. Strauch: Normalwerte kollagenolytischer Enzyme im menschlichen Serum. Klin.Wschr. 48, 441-442 (1970)

60. Gries, G., L. Strauch, K. Grassedyck u. J. Lindner:
Die Bestimmung von Kollagenpeptidasen in
tierischen Geweben.
Z.Rheumaforsch. 31, 93-98 (1972)
61. Grillo, H.C., and J. Gross: Collagenolytic activity and
epithelial-mesenchymal interactions in healing
mammalian wounds. Paper from platform.
J.cell.Biol. 23, 39 (1964)
62. Gross, J.: Studies on the formation of collagen II.
The influence of growth rate on neutral salt
extracts of Guinea pig dermis.
J.exp.Med. 107, 265-277 (1958)
63. Gross, J.: in: Page, H. (Ed.): Connective Tissue,
Thrombosis and Artherosclerosis.
New York: 1959
64. Gross, J.: The animal collagenases, in: Chemistry and
molecular biology of the intercellular matrix,
Vol. 3, Balazs, E.A. (Ed.)
New York: Academic Press 1970, pp. 1623-1636
65. Gross, J., and A.B. Bruschi: The pattern of collagen
degradation in cultured tadpole tissues.
Develop.Biol. 26, 36-41 (1971)
66. Gross, J., and C.M. Lapiere: Collagenolytic activity
in amphibian tissues: A tissue culture assay.
Proc.nat.Acad.Sci. (Wash.) 48, 1014-1022 (1962)
67. Gross, J., C.I. Levene, and S. Orloff: Fragility and
extractable collagen in the lathyrctic chick
embryo: An assay for lathyrogenic agents.
Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.) 105, 148-151 (1960)

68. Günther, T. u. P.M. Carsten: Über die Löslichkeit von Kollagen in Abhängigkeit von Nebennierenhormonen.
Naturwissenschaften 48, 699-702 (1961)
69. Hahn, O., R.J. Fricke, E. Hoffmann-Blume u. K. Predel: Die Bedeutung der Kollagenpeptidaseaktivitätsbestimmung in der Differentialdiagnose chronischer Lebererkrankungen.
Z.ges.inn.Med. 29, 327-331 (1974)
70. Halbgewachs, H.: Die Kollagenasen, bisheriger Wissens- und Erfahrungsstand.
Mainz: Med.Diss. 1973
71. Halme, J., K.I. Kivirikko, and K. Simons: Isolation and partial characterization of highly purified procollagen prolin hydroxylase.
Biochim.biophys.Acta (Amst.) 198, 460-470 (1970)
72. Hamlin, C.R., and R.R. Kohn: Evidence for progressive, age-related structural changes in post-mature human collagen.
Biochim.biophys.Acta (Amst.) 236, 458-467 (1971)
73. Hannig, K., and K.A. Nordwig: Amino acid sequences in collagen, in: Treatise on collagen. Vol. 1: Chemistry of collagen. Ramachandran, G.N. (Ed.) London and New York: Academic Press 1967, pp. 75-101
74. Harkness, R.D., A.M. Marko, H.M. Muir, and A. Neuberger: The metabolism of collagen and other proteins of the skin of rabbits.
Biochem.J. 56, 558-569 (1954)

75. Harper, E., and J. Gross: Separation of collagenase and peptidase activities of tadpole tissues in culture.
Biochim.biophys.Acta (Amst.) 198, 286-292 (1970)
76. Harris, E.D.jr., D.R. Dibona, and S.M. Krane: Collagenases in human synovial fluid.
J.clin.Invest. 48, 2104-2113 (1969)
77. Harris, E.D.jr., and S.M. Krane: An endopeptidase from rheumatoid synovial tissue culture.
Biochim.biophys.Acta (Amst.) 258, 566-570 (1972)
78. Harris, E.D.jr., and S.M. Krane: Collagenases (second of three parts).
New Engl.J.Med. 291, 605-609 (1974)
79. Harris, E.D.jr., and P.A. McCroskery: The influence of temperature and fibril stability on degradation of cartilage collagen by rheumatoid synovial collagenase.
New Engl.J.Med. 290, 1-6 (1974)
80. Hartmann, F.: Die Hydroxyprolinausscheidung im Urin bei Normalpersonen und Patienten mit rheumatischen Erkrankungen.
Klin.Wschr. 44, 1053-1058 (1966)
81. Hartmann, F.: Das Verhalten der Hydroxyprolinausscheidung beim experimentellen Osteo-Angio-Lathyrismus unter einer Cortisonbehandlung.
Z.Rheumaforsch. 32, 106-112 (1973)
82. Hartmann, F., K. Seifert u. S. Bölsing: Experimenteller Lathyrismus.Modell einer generalisierten Mesenchymerkrankung.
Z.Zellforsch. 59, 358-394 (1963)

83. Heidrich, H.G., D. Prokopova, and K. Hannig: The use of synthetic substrates for the determination of mammalian collagenases. Is collagenolytic activity present in mitochondria ? Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 350, 1430-1436 (1969)
84. Hirayama, C., I. Morotomi, and K. Hiroshige: Quantitative and metabolic changes of hepatic collagens in rats after carbon tetrachloride poisoning. Biochem.J. 118, 229-232 (1970)
85. Hirayama, C., I. Morotomi, and K. Hiroshige: Corticosteroid effect on hepatic collagens. Experientia (Basel) 27, 693-694 (1971)
86. Hoffmann-Blume, E., R.J. Frücke u. O. Hahn: Das Verhalten von Kollagenpeptidaseaktivität in der Rattenleber bei chronischer CCl_4 -Schädigung. Z.Rheumaforsch. 32, 460-467 (1973)
87. Holzmann, H., G.W. Korting u. B. Morsches: Kathepsin-Bestimmung im Serum bei lathyritischen und mit Prednison behandelten lathyritischen Ratten. Naturwissenschaften 52, 308 (1965)
88. Mouck, J.C.: The effect of cortisol and salicylate upon connective tissue. Amer.J.Path. 41, 363-371 (1962)
89. Mouck, J.C., and R.A. Jacob: Connective tissue VII. Factors inhibiting the dermal chemical response to cortisol. Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.) 113, 692-696 (1963)

90. Houck, J.C., and Y.M. Patel: Proposed mode of action of corticosteroids on the connective tissue. *Nature (Lond.)* 206, 158-160 (1965)
91. Houck, J.C., and V.K. Sharma: Induction of collagenolytic and proteolytic activities in rat and human fibroblasts by anti-inflammatory drugs. *Science* 161, 1361-1362 (1968)
92. Ito, T.: Biochemical studies on the connective tissue. 2. Effect of cortisone acetat on the connective tissue. *Kumamoto med.J.* 17, 79-89 (1964)
93. Jackson, D.S.: Connective tissue growth stimulated by carrageenin. I. The formation and removal of collagen. *Biochem.J.* 65, 277-284 (1957)
94. Jackson, D.S.: Temporal changes in collagen: aging or essential maturation ? in: *Advances in Biology of skin*. Vol. 6: Aging. Montagna, W. (Ed.) Oxford: Pergamon Press 1965, pp. 219-228
95. Jackson, D.S., and J.P. Bently: On the significance of the extractable collagens. *J.biophys.biochem.Cytol.* 7, 37-42 (1960)
96. Jasin, H.E., and M. Ziff: Relationship between soluble collagen and urinary hydroxyproline in the lathyrtic rat. *Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.)* 110, 837-841 (1962)

97. Jeffrey, J.J., R.J. Coffey, and A.Z. Eisen: Studies on uterine collagenase in tissue culture. I. Relationship of enzym production to collagen metabolism. *Biochim.biophys.Acta (Amst.)* 252, 136-142 (1971)
98. Jeffrey, J.J., and J. Gross: Isolation and characterization of mammalian collagenolytic enzyme. *Fed.Proc.* 26, 670-674 (1966)
99. Jocma, V.H., and Z. Hruza: Differences in properties of newly formed collagen during aging and parabiosis. *J.Geront.* 27, 178-182 (1972)
100. Juva, K., and D.J. Prockop: Puromycin inhibition of collagen synthesis as evidence for a ribosomal or postribosomal site for the hydroxylation of prolin. *Biochim.biophys.Acta (Amst.)* 91, 174-176 (1964)
101. Juva, K., and D.J. Prockop: An effect of puromycin on the synthesis of collagen by embryonic cartilage in vitro. *J.biol.Chem.* 241, 4419-4425 (1966)
102. Kaidbey, K.H., A.K. Kurban, and K. Tenekjian: Collagenolytic-like activity of normal human epidermis. *Arch.Derm.Forsch.* 242, 1-5 (1972)
103. Kang, A.H., Y. Nagai, K.A. Piez, and J. Gross: Studies on the structure of collagen utilizing a collagenolytic enzyme from tadpole. *Biochemistry* 5, 509-515 (1966)

104. Keiditsch, E. u. L. Strauch: Die Beziehung der Kollagenaseaktivität zum DNS-Gehalt im carcinoma solidum simplex mammae.
Verh.dtsch.Ges.Path. 54, 438-442 (1970)
105. Ketchum, L.D., D.W. Robinson, and F.W. Masters: Degradation of mature collagen.
Surg.Forum 17, 485-487 (1966)
106. Kibrick, A.C., and K.D. Singh: Hydroxyproline excreted in the urine: its source from collagen of tissues after ¹⁴C-proline in rats with and without administration of prednisone.
J.clin.Endocr. 38, 594-601 (1974)
107. Kirschke, H. u. H. Hanson: Untersuchungen über den Kollagenabbau durch Rattenorgane. Differenzierung und Charakterisierung Prolinpeptid-spaltender Enzyme.
Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 350, 1437-1448 (1969)
108. Kirschke, H., J. Lasch u. H. Hanson: Untersuchung über Vorkommen und Kinetik von Tripeptidasen in der Rattenniere.
Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 350, 1449-1459 (1969)
109. Kivirikko, K.I., and O. Laitinen: Effect of cortisone on the serum and urine of young rats.
Acta physiol.scand. 64, 356-360 (1965)
110. Kivirikko, K.I., O. Laitinen, J. Aer, and J. Halme: Studies with ¹⁴C-proline on the action of cortisone on the metabolism of collagen in the rat.
Biochem.Pharmacol. 14, 1445-1451 (1965)

111. Kivirikko, K.I., and D.J. Prockop: Enzymatic hydroxylation of proline and lysine in protocollagen. Proc.nat.Acad.Sci.(Wash.) 67, 782-789 (1967)
112. Kivirikko, K.I., and D.J. Prockop: Purification and partial characterization of the enzyme for the hydroxylation of proline in protocollagen. Arch.Biochem. 118, 611-618 (1967)
113. Kivirikko, K.I., and D.J. Prockop: Hydroxylation of proline in synthetic polypeptides with purified protocollagen hydroxylase. J.biol.Chem. 242, 4007-4012 (1967)
114. Kivirikko, K.I., and D.J. Prockop: Partial purification and characterization of protocollagen lysin hydroxylase from chick embryos. Biochim.biophys.Acta (Amst.) 258, 366-379 (1972)
115. Koller, S.: Neue graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen. 4. Auflage. Darmstadt: Dr.Dietrich Steinkopff 1969
116. Koren, E., and S. Milkovic: "Collagenase-like" peptidase in human, rat and bull spermatozoa. J.Reprod.Fertil. 32, 349-356 (1973)
117. Korting, G.W. u. H. Holzmann: Die Sklerodermie und ihr nahestehende Bindegewebsprobleme. Stuttgart: Thieme 1967
118. Korting, G.W. u. B. Morsches: Zum Verhalten der Kollagenpeptidase im Serum bei verschiedenen Hautkrankheiten. Arch.Derm.Forsch. 251, 191-197 (1975)

119. Krane, S.M., and E.D. Harris jr.: Collagenases and peptidases in cultures of rheumatoid synovium, in: Rheumatoid Arthritis, Müller, W., H.G. Harwerth, and K. Fehr (Eds.) London and New York: Academic Press 1971
120. Krane, S.M., A.J. Munoz, and E.D. Harris jr.: Urinary polypeptides related to collagen synthesis. J.clin.Invest. 49, 716-729 (1970)
121. Kühn, K.: Untersuchungen über die intra- und intermolekularen Bindungen des Kollagens. Leder 14, 287-293 (1963)
122. Kühn, K.: Der Stoffwechsel des Kollagens unter Einfluß von β -Aminopropionitril und Prednison. Beitr.Silikose-Forsch. 6, 167-175 (1965)
123. Kühn, K., M. Durruti, P. Iwangoff, F. Hammerstein, K. Stecher, H. Holzmann u. G.W. Korting: Untersuchungen über den Stoffwechsel des Kollagens. I. Der Einbau von ^{14}C -Glycin in Kollagen bei lathyritischen Ratten. Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 336, 4-12 (1964)
124. Kühn, K., P. Fietzek, and J. Kühn: The action of proteolytic enzymes on collagen. Biochem.Z. 344, 418-434 (1966)
125. Kühn, K., H. Holzmann u. G.W. Korting: Quantitative Bestimmungen der löslichen Kollagenvorstufen nach Anwendung einiger Bindegewebs-therapeutika. Naturwissenschaften 49, 134-135 (1962)

126. Kühn, K., P. Iwangoff, F. Hammerstein, K. Stecher, M. Durruti, H. Holzmann u. G.W. Korting: Untersuchungen über den Stoffwechsel des Kollagens. II. Der Einbau von ^{14}C -Glycin in Kollagen bei mit Prednison behandelten Ratten. Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 337, 249-256 (1964)
127. Kühn, K., K. Stecher, P. Iwangoff, F. Hammerstein, M. Durruti, H. Holzmann, and G.W. Korting: Studies on the metabolism of collagen. III. The incorporation of ^{14}C -glycin into collagen of rats treated with progesterone. Biochem.Z. 343, 528-536 (1965)
128. Kulonen, E., and J. Pikkarainen: Comparative studies on the chemistry and chain structure of collagen, in: Chemistry and molecular biology of the intercellular matrix. Vol. 1, Balazs, E.A. (Ed.) New York: Academic Press 1970, pp. 81-98
129. Kuschinsky, G. u. H. Lüllmann: Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie, 6. Auflage Stuttgart: Thieme 1974
130. Laitinen, O.: The metabolism of collagen and its hormonal control in the rat. With special emphasis on the interactions of collagen and calcium in the bones. Acta endocr. (Kbh.) Suppl. 120 (1967)
131. Laitinen, O., E.A. Nikkilä, and K.I. Kivirikko: Hydroxyproline in the serum and urine. Normal values and clinical significance. Acta med.scand. 179, 275-284 (1966)

132. Langer, E., E. Keiditsch, L. Strauch u. K. Hanning:
Die Kollagenaseaktivität im carcinoma simplex
mammarum.
Verh.dtsch.Ges.Path. 52, 438-440 (1968)
133. Langness, U.: Hydroxyprolinausscheidung und Kollagen-
stoffwechsel.
Dtsch.med.Wschr. 95, 2530-2535 (1970)
134. Langness, U.: Collagen-like Protein.
Dtsch.med.Wschr. 96, 475-477 (1971)
135. Lapiere, CH.M., and B. Nusgens: Polymerization of
procollagen in vitro.
Biochim.biophys.Acta (Amst.) 342, 237-246
(1974)
136. Layman, D.L., and R.Ross: The production and se-
cretion of procollagenpeptidase by human
fibroblasts in culture.
Arch.Biochem. 157, 451-456 (1973)
137. Lazarus, G.S.: Collagenase: its physiological and
pathological role.
Med.Tms. 98, 83-87 (1970)
138. Lazarus, G.S., J.R. Daniels, R.S. Brown, H.A. Bladen
and H.M. Fullmer: Degradation of collagen
by a human granulocyte collagenolytic system.
J.clin.Invest. 47, 2622-2629 (1968)
139. Lazarus, G.S., J.R. Daniels, J. Lian, and M.C.
Burleigh: Role of granulocyte collagenase
in collagen degradation.
Amer.J.Path. 68, 565-578 (1972)

140. Lazarus, G.S., and H.M. Fullmer: Collagenase production by human dermis in vitro.
J.invest.Derm. 52, 545-547 (1969)
141. Leibovich, S.J., and J.B. Weiss: Electronmicroscope studies of the effect of endo- and exopeptidase digestion on tropocollagen. A novel concept of the role of terminal regions in fibrillogenesis.
Biochim.biophys.Acta (Amst.) 214, 445-454 (1970)
142. Le Roy, E.C., and S.M. Wolff: Variations in plasma levels of a hydroxyprolinecontaining protein with fever and inflammation in man.
Artr.and Rheum. 2, 281-287 (1966)
143. Levene, C.I., and J. Gross: Alterations in connective tissue properties in the lathyrotic chick embryos.
Fed.Proc. 18, 90-103 (1959)
144. Lindner, J.: Abbauende Enzyme des Bindegewebes, in: Spier, H.W. u. G. Stüttgen: Verhandlungen der deutschen dermatologischen Gesellschaft, 29. Tagung 1971
Arch.Derm.Forsch. 244, 104-112 (1971)
145. Lindner, J.: Effects of antirheumatic drugs on connective tissue metabolic capacities. Important factors in their evaluation, in: Rheumatoid Arthritis. Müller, W., H.G. Harwerth, and K. Fehr (Eds.)
London and New York: Academic Press 1971, pp. 551-570

146. Lindner, J., G. Gries, K. Grasedyck, and H. Ueberberg:
Apolar angreifende Kollagenpeptidasen verschiedener Kaninchenorgane und deren Beeinflussung durch Thymectomie und experimentelle Arthritis.
Z.Rheumaforsch. 30, 86-91 (1971)
147. Mäkinen, K.K.: Characteristics of the hydrolysis of 4-phenyl-azobenzyloxycarbonyl-L-prolyl-L-leucyl-L-glycyl-L-prolyl-D-arginine (a collagenase-substrate) by enzyme preparations derived from carious dentine.
Acta Odont.scand. 28, 485-497 (1970)
148. Mäkinen, K.K.: Demonstration of collagenolytic enzyme activity in human carious dentine.
Caries Res. 5, 25-26 (1971)
149. Mailliot de la Treille, v.K., K. Rexilius, and L. Strauch: Report of 12th Internat. Congr. Rheumatology, Prague, 6.-11. October 1969, Abstracts No 720 (zitiert nach 224)
150. Mancini, R., S. Stringa, and L. Canepa: The action of ACTH, cortisone and prednisone on the connective tissue of normal and sclerodermic human skin.
J.invest.Derm. 34, 393-417 (1960)
151. Mandl, I.: Collagenase.
Science 169, 1234-1238 (1970)
152. Manner, G., and B.S. Gould: Action of hydrocortisone on the distribution and collagenforming activity of chick embryo polysomes.
Dept.Biol.Mass.Inst.Technol. p. 359 (1965)

153. Manthorpe, R., G. Helin, E. Kofod, and I. Lorenzen: Effects of glucocorticoid on connective tissue of aorta and skin in rabbits. Acta endocr. (Kbh.) 77, 310-324 (1974)
154. Martin, G.R., J. Gross, K.A. Piez, and S. Lewis: On the intramolecular cross-linking of collagen in lathyritic rats. Biochim.biophys.Acta (Amst.) 53, 599-601 (1961)
155. Martin, G.R., S.G. Mergenhagen, and D.J. Prockop: Influence of scurvy and lathyrism (odoratism) on hydroxyproline excretion. Nature (Lond.) 191, 1008-1009 (1961)
156. Martin, G.R., K.A. Piez, and M.S. Lewis: The incorporation of ¹⁴C-glycine into the subunits of collagens from normal and lathyritic animals. Biochim.biophys.Acta (Amst.) 69, 472-479 (1963)
157. Massaro, D., A.E. Handler, S. Katz, and R.C. Young jr.: Excretion of hydroxyproline in patients with sarcoidosis. Amer.Rev.resp.Dis. 93, 929-933 (1966)
158. McCroskery, P.A., S. Wood jr., and E.D. Harris jr.: Gelatin: a poor substrate for a mammalian collagenase. Science 182, 70-71 (1973)
159. Meilman, E., M.M. Urivetzky, and C.M. Rapaport: Urinary hydroxyproline peptides. J.clin.Invest. 42, 40-50 (1963)
160. Mikkonen, L., T. Touminen, and E. Kulonen: Collagen fractions on lathyritic rats. Biochem.Pharmacol. 3, 101-103 (1960)

161. Miller, E.J., and V.J. Matukas: Biosynthesis of collagen. The biochemist's view.
Fed.Proc. 33, 1197-1204 (1974)
162. Mitchell, W.M.: Pseudocollagenase: A protease from clostridium histolyticum.
Biochim.biophys.Acta (Amst.) 159, 554-557 (1968)
163. Mittenecker, E.: Planung und statistische Auswertung von Experimenten. 8. neubearbeitete Auflage
Wien: Franz Deuticke 1970
164. Morsches, B.: Tierexperimentelle Untersuchungen über die Beziehungen zwischen der Hydroxyprolin-ausscheidung im Urin und der Hydroxyprolin-fraktion im Serum.
Mainz: Habil.-Schrift 1973
165. Morsches, B., H. Holzmann u. G.W. Korting: Untersuchungen zum quantitativen Verhalten von Kollagen und nicht-kollagenem Eiweiß in der menschlichen Haut in Abhängigkeit von Alter und Lokalisation.
Arch.klin.Derm. 224, 117-127 (1966)
166. Morsches, B., H. Holzmann, G.W. Korting u. M. Braun: Zum Einfluß von bindegewebswirksamen Substanzen auf den Leucinaminopeptidasegehalt im Rattenserum.
Arzneimittel-Forsch. 16, 1081-1083 (1966)
167. Morsches, B., H. Holzmann u. A. Schlaudecker: Untersuchungen zum Verhalten des "Collagen-like Protein" im Serum von Ratten in Abhängigkeit vom Alter und nach der Anwendung verschiedener bindegewebswirksamer Substanzen.
Ärztl.Forsch. 21, 421-430 (1967)

168. Müller, K., K. Wurm, B. Stojan u. M. Tariverdian:
Beitrag zu immunologischen Befunden und En-
zymaktivitäten im Serum bei Patienten mit
Sarkoidose.
Dtsch.med.Wschr. 98, 1253-1255 (1973)
169. Nagai, Y.: Vertebrate collagenase: further characteri-
zation and significance of its latent form
in vivo.
Mol.Cell.Biochem. (Den Haag) 1, 137-145 (1973)
170. Nagai, Y., Ch.M. Lapiere, and J. Gross: Tadpole colla-
genase. Preparation and purification.
Biochemistry 5, 3123-3130 (1966)
171. Nanda, V., and R. Nanda: Cell proliferation and cell
function of the mesenchymal cells of lathy-
ritic rats, as revealed by the nuclear size.
Experientia (Basel) 28, 1091-1092 (1972)
172. Neuberger, A., J.C. Perrone, and H.G.B. Slack: The
relative metabolic inertia of tendon collagen
in the rat.
Biochem.J. 49, 199-204 (1951)
173. Nimni, M.E., E. De Guia, and L.A. Bavetta: Synthesis
and turnover of collagen precursors in rabbit
skin.
Biochem.J. 102, 143-147 (1967)
174. Nordwig, A.: Collagenolytic enzymes.
Advanc.Encymol. 34, 155-205 (1971)

175. Nordwig, A., E. Rogall, and U. Hayduk: The isolation and characterization of collagen from three invertebrate tissues, in: Chemistry and molecular biology of the intercellular matrix. Vol. 1, E.A. Balazs (Ed.)
New York: Academic Press 1970, pp. 27-42
176. Öbrink, B.: Non-aggregated tropocollagen at physiological pH and ionic strength. A chemical and physico-chemical characterization of tropocollagen isolated from the skin of lathyrotic rats.
Europ.J.Biochem. 25, 263-572 (1972)
177. Orbison, J.L., C. McCray, and M. Callahan: Urinary excretion and serum composition of lathyrotic rats.
Arch.Path. 79, 292-298 (1965)
178. Paff, H.G., and R. Stewart: Free wandering cells and cortisone.
Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.) 83, 591-592 (1953)
179. Page, R.C., and E.P. Benditt: Diseases of connective and vascular tissues. IV. The molecular basis for lathyrism.
Lab.Invest. 26, 22-26 (1972)
180. Paik, W.C., and J.J. Lalich: The relation of rat strain to tissue response in experimental lathyrism.
Arch.Path. 90, 316-319 (1970)
181. Pauling, L.: Die Natur der chemischen Bindung.
Weinheim: Verlag Chemie 1964

182. Piez, K.A.: Soluble collagen and the components resulting from its denaturation, in: Treatise on collagen. Vol. 1: Chemistry of collagen. G.N. Ramachandran (Ed.)
London and New York: Academic Press 1967
183. Piez, K.A.: Cross-linking of collagen and elastin.
Ann.Rev.Biochem. 37, 547-570 (1968)
184. Pikkarainen, J.: The molecular structures of vertebrate skin collagens. A comparative study.
Acta physiol.scand. Suppl. 309 (1968)
185. Platt, D.: Aktivitätsmessungen einer Peptidyl-Peptid-Hydrolase in Leber und Uterus der Ratte nach Gabe von Äthinylöstradiol/Norgestrel.
Arzneimittel-Forsch. 22, 1199-1201 (1972)
186. Ponseti, I.V., and F. Aleu: Fracture healing in rats treated with aminocetonitrile.
J.Bone Jt.Surg. 40-A, 1093-1102 (1958)
187. Popper, H., and S. Udenfriend: Hepatic fibrosis. Correlation of biochemical and morphologic investigations.
Amer.J.Med. 49, 707-721 (1970)
188. Prellwitz, W.: Klinisch-chemische Diagnostik.
Stuttgart: Thieme 1972
189. Prockop, D.J.: Isotopic studies on collagen degradation and the urine excretion of hydroxyproline.
J.clin.Invest. 43, 453-460 (1964)
190. Rabadjija, L., E. Koren, and B. Pende: Studies on the composition of extracellular fluid from calf costal cartilage.
Biochim.biophys.Acta (Amst.) 230, 620-629 (1971)

191. Ramachandran, G.N.: Infrared spectrum and structure of collagen.
J.chem.Physics 23, 600-601 (1955)
192. Ramachandran, G.N., and G. Kartha: Strucutre of collagen.
Nature (Lond.) 176, 593-595 (1955)
193. Reich, G.: Kollagen. Eine Einführung in Methoden, Ergebnisse und Probleme der Kollagenforschung.
Dresden: Theodor Steinkopff 1966
194. Rich, A., and F.H.C. Crick: The structure of collagen.
Nature (Lond.) 176, 915-916 (1955)
195. Rodermund, O.E.: Das Verhalten von Hauteiweissen unter hochdosierter Corticosteroidzufuhr. Experimentelle Untersuchungen an Ratten.
Arch.Derm.Forsch. 241, 156-165 (1971)
196. Rohrbach, R., C. Thomas, R. Rümpler u. M. Lau: Die Kollagenaseaktivität und der Kollagengehalt der Haut während der Carcinogenese.
Verh.dtsch.Ges.Path. 54, 442-450 (1970)
197. Ross, R.: The connective tissue fiber forming cell, in: Treatise on collagen. Vol. 2: Biology of collagen. Part A, B.S. Gould (Ed.)
London and New York: Academic Press 1968, pp. 1-83
198. Sakai, T., and J. Gross: Some properties of products of reaction of tadpole collagenase with collagen.
Biochemistry 6, 518-527 (1967)

199. Sakai, T., T. Oda, Y. Yokono, S. Igarashi, H. Suzuki, and Y. Yoshitoshi: Collagenase-like peptidase activity in fibrotic liver tissue.
Clin.chim.Acta 15, 321-324 (1967)
200. Schlaudecker, R.: Untersuchungen zum Verhalten des "Collagen-like Protein" im Serum.
Mainz: Med.Diss. 1967
201. Schmitt, F.O. u. A.J. Hodge: Das Tropokollagen-Makromolekül und die Eigenschaften seiner geordneten Aggregationsformen.
Leder 11, 74-91 (1960)
202. Selye, H.: Lathyrism.
Rev.canad.Biol. 16, 1-82 (1957)
203. Siegel, R.C., and G.R. Martin: Collagen cross-linking; enzymatic synthesis of lysine-derived aldehydes and production of cross-linked components.
J.biol.Chem. 245, 1653-1658 (1970)
204. Siegel, R.C., S.R. Pinnel, and G.R. Martin: Cross-linking of collagen and elastin. Properties of lysyloxidase.
Biochemistry 9, 4486-4492 (1970)
205. Siuko, H., J. Sävelä, and E. Kulonen: Effect of hydrocortisone on the formation of collagen in guinea pig skin.
Acta endocr. (Kbh.) 31, 113-116 (1959)
206. Sjoerdsma, A., S. Udenfriend, H. Keiser, and E.C. Le Roy: Hydroxyproline and Collagen metabolism. Clinical implications.
Ann.intern.Med. 63, 672-694 (1965)

207. Smith, E.T., and D.J. Allison: Skin and femur collagens and urinary hydroxyproline of cortisone-treated rats.
Endocrinology 77, 785-791 (1965)
208. Sobel, H., and J. Mamorston: The effect of cortisone on the collagen and hexosamine content of the skin and femurs of one year old rats.
Endocrinology 55, 21-27 (1954)
209. Sobel, H., and J. Mamorston: The possible role of the gelfiber ratio of connective tissue in the aging process.
J.Geront. 11, 2-7 (1956)
210. Sobel, H., S. Gabay, C. Johnson, and B. Hassan: Carass nitrogen and the hexosamine-collagen ratio of the skin following starvation and cortisone administration in rats and guinea pigs.
Metabolism 8, 180-184 (1959)
211. Speakman, P.T.: Proposed mechanism for the biological assembly of collagen triple helix.
Nature (Lond.) 229, 241-243 (1971)
212. Steen, A.S.: Effect of cortisone on tissue cultures.
Br.J.Ophtal. 35, 741-749 (1951)
213. Steven, F.S., and D.S. Jackson: Isolation and amino acid composition of insoluble elastin, bovine foetal and adult aorta and ligamentum nuchae.
Biochim.biophys.Acta (Amst.) 168, 334-340 (1968)
214. Stojan, B., and W. Müller: Report at Deutsch.-Österr.-Schweiz.-Kongress für physikalische Medizin einschließlich Balneologie und Bioklimatologie.
Lindau 7.-9.Oktober 1974 (zit. nach 224)

215. Stojan, B., W. Müller, and D. Versani: Collagen peptidase activity in the synovial membrane, serum and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis, in: Rheumatoid Arthritis, Müller, W., H.G. Harwerth, and K. Fehr (Eds.)
London and New York: Academic Press 1971, pp. 169-171
216. Stojan, B., W. Müller, K. Wurm u. M.T. Tariverdian: Beitrag zu immunologischen Befunden und Enzymaktivitäten im Serum bei Patienten mit Sarkoidose.
Praxis 61, 591-593 (1972)
217. Stojan, B., W. Müller, K. Wurm u. M.T. Tariverdian: Die Kollagenpeptidase als Maß des Kollagenumsatzes bei Sarkoidose.
Schweiz.med.Wschr. 103, 337-341 (1973)
218. Strauch, L.: Report at the 5th International Symposium of the Société de Dermochimie.
Paris 25.November 1966 (zit. nach 224)
219. Strauch, L.: Kollagenasen aus Zellen des Menschen und höher entwickelter Tiere .
Mitt.Max-Planck-Ges. (München) 1, 40-56 (1968)
220. Strauch, L.: Report of 12th International Congress of Rheumatology.
Prague 6.-11.October 1969, Abstract N^o 716
(zit. nach 224)
221. Strauch, L.: Collagen-peptidases, a new group of collagendigesting enzymes, in: Rheumatoid Arthritis, Müller, W., H.G. Harwerth, and K. Fehr (Eds.)
London and New York: Academic Press 1971, pp. 157-164

222. Strauch, L.: in: Tissue Interactions in Carcinogenesis
Tardin, D. (Ed.)
London and New York: Academic Press 1972,
pp. 399-433
223. Strauch, L.: Über die Spezifität synthetischer Peptid-
substrate zur Bestimmung der kollagenoly-
tischen Enzyme.
Vortrag Arbeitstagung Dtsch.Österr. und
Schweiz.Ges.klin.Chem. Wien 1971
224. Strauch, L.: Collagen-peptidases, a new group of
enzymes involved in collagen Degradation in
mammals.
Report 22nd Colloquium "Properties of the
Biological Fluids"
Brugge 1974
225. Strauch, L., W. Brandmair, and R. Lang: Tissue cul-
tures as models for the study of collagen
metabolism, in: Rheumatoid Arthritis, Müller,
W., H.G. Harwerth, and K. Fehr (Eds.)
London and New York: Academic Press 1971,
pp. 119-122
226. Strauch, L., and J.H. Vencel: Collagenase in mammalian
cells.
Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 348, 465-468
(1967)
227. Strauch, L., J.H. Vencel, u. K. Hanning: Kollagenasen
in Zellen höher entwickelter Tiere.
Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 349, 171-178
(1968)

228. Taubenhaus, M., M. Jacobson, J.V. Morton, and K. Levine: Parallel inhibition of granulation tissue by cortisone, hydroxycortisone, dibenamine and banthine.
Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.) 64, 646-651 (1953)
229. Ther, L., H. Schramm u. G. Vogel: Über die antagonistische Wirkung von Trijodthyronin und Progesteron auf den Prednisoneneffekt am Epiphysenknorpel (Prüfung auf Reißfestigkeit).
Acta endocr. (Kbh.) 42, 29-36 (1963)
230. Trnavska, Z., K. Trnavsky, and K. Kühn: The influence of sodium salicylate on the metabolism of collagen in the lathyritic rat.
Biochem.Pharmacol. 17, 1501-1509 (1966)
231. Little, J., R. Teer, and I.K. Mustakallio: Corticosteroidinduced inhibition of the biosynthesis of human skin collagen.
Biochem.Pharmacol. 21, 2161-2167 (1972)
232. Vogel, G.: Veränderungen der mechanischen Eigenschaften des Bindegewebes unter dem Einfluß von Hormonen.
11.Symposium Dtsch.Ges.Endokrinologie: Das Cushingsyndrom Düsseldorf, März 1964, S. 165-170
233. Vogel, G. u. L. Ther: Tierexperimentelle Untersuchungen über den Einfluß von Hormonen auf die physikalischen Eigenschaften von Knochen.
Verh.dtsch.Ges.Path. 47, 162-172 (1963)

234. Vogel, G. u. L. Ther: Untersuchungen über den Einfluß endokriner Faktoren auf die Reißfestigkeit bindegewebiger Strukturen.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp.Path.Pharmak. 246, 72-77 (1963)
235. Wawzonek, S., I.V. Ponseti, R.S. Shepard, and L.G. Wiedenmann: Epiphyseal plate lesions, degenerative arthritis and dissecting aneurysms of the aorta produced by aminopropionitriles.
Science 121, 63-65 (1955)
236. Weissmann, G.: Lysosomes and the mediation of tissue injury in arthritis, in: Rheumatoid Arthritis, Müller, W., H.G. Harwerth, and K. Fehr (Eds.) London and New York: Academic Press 1971, pp. 141-156
237. Weissmann, G.: The effects of corticosteroids, especially on lysosomes and biomembranes, in: Rheumatoid Arthritis, Müller W., H.G. Harwerth, and K. Fehr (Eds.) London and New York: Academic Press 1971
238. Weissmann, G., and L. Thomas: Studies on lysosomes. II. The effect of cortisone on the release of acid hydrolases from a large granule fraction of rabbit liver induced by an excess of vitamin A.
J.clin.Invest. 42, 661-669 (1963)
239. Wirtschafter, Z.T., and J.P. Bentley: The influence of age and growth rate on the extractable collagen of skin of normal rats.
Lab.Invest. 11, 316-320 (1962)

240. Woessner, J.F.jr.: Biological mechanisms of collagen resorption, in: Treatise on collagen. Vol. 2: Biology of Collagen, Part B, Gould, B.S. (Ed. London and New York: Academic Press 1971, pp. 255-320
241. Woods, J.F., and G. Nichols jr.: Distribution of collagenase in rat tissue.
Nature (Lond.) 208, 1325-1326 (1965)
242. Wünsch, E. u. H.G. Heidrich: Zur quantitativen Bestimmung der Kollagenase.
Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 333, 149-151 (1963)

Lebenslauf

Am 30.12.1951 wurde ich, Ulrich Ernst Jakob Heidebüchel, als Sohn des praktischen Arztes Dr. med. Johannes Heidebüchel und der Volksschullehrerin Paula Heidebüchel, geb. Hütz, in Essen a.d. Ruhr als erstes von zwei Kindern geboren. Nach vierjähriger Volksschulzeit besuchte ich die mathematisch-naturwissenschaftliche Alfred-Krupp-Schule bis zum Abitur 1970. Anschließend schrieb ich mich zum Studium der Zahnmedizin und Medizin an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz ein, wo ich 1973 die ärztliche und zahnärztliche Vorprüfung mit der Note "sehr gut" bestand. Im Jahre 1976 beabsichtige ich, das medizinische Staatsexamen in Mainz abzulegen.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. E. Morsches möchte ich für die Überlassung des Themas sowie für die jederzeit gewährten wertvollen Ratschläge und Anregungen zu dieser Arbeit und für die Übernahme des Referates meinen herzlichen Dank aussprechen.

Herrn Prof. Dr. med. G.W. Korting gilt mein Dank für die freundliche Übernahme des Korreferates, sowie für die Möglichkeit zur Durchführung der experimentellen Untersuchung an der Hautklinik.

Herrn Dipl.-Math. G. Wetter danke ich für die verständnisvolle Beratung bei der statistischen Auswertung der Messungen.

